

Zur Calciumphosphatpräzipitation mit Phosphoserin, Fetuin,
Osteocalcin, Kollagen und in Vesikeln

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.)

vorgelegt der Fakultät Maschinenwesen
der Technischen Universität Dresden

von Diplom-Geologen Ralf-René Rühl
geb. 19. Juni 1975 in Mainz

Gutachter der Arbeit: Herr Prof. Dr. Wolfgang Pompe
Herr Prof. Dr. Hans-Peter Wiesmann

Tag der Verteidigung: 17. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Biomineralisation	1
1.2	Calciumphosphat	6
1.3	Phosphoserin	10
1.4	Kollagen	11
1.5	Osteocalcin	12
1.6	Fetuin	13
1.7	Matrixvesikel	14
1.8	Fragestellung der Dissertation	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Computermodellierung	20
2.2	Chemikalien und Lösungen	24
2.3	FT-IR-Messungen	28
2.4	UV/Vis-Messungen	28
2.5	Massenspektroskopische Experimente	30
2.6	REM	32
2.7	TEM	34
2.8	AFM	35
2.9	NMR	41
2.10	XRD	41
3	Ergebnisse und Interpretation	43
3.1	Calciumphosphat	44
3.2	Phosphoserin	58
3.3	Fetuin	88
3.4	Osteocalcin	101
3.5	Kollagen	107
3.6	Künstliche Vesikel	112
4	Abschließende Zusammenfassung	121
	Anhang	127
	Erläuterungen zu den Ergebnissen	128
	Glossar	174
	Abbildungsverzeichnis	189
	Tabellenverzeichnis	190
	Literaturverzeichnis	192
	Erklärung, Danke	216
	Publikationen	218
	Index	219

Abkürzungen

Ø	arithmetischer Mittelwert	MALDI	<i>engl.: matrix assisted laser desorption ionization</i>
Å	Ångström (= 0,1 nm = 10 ⁻¹⁰ m)	min	Minute
ACP	amorphes Calciumphosphat	m	Meter
AFM	Atomkraftmikroskop	MO	Molekülorbital
apci	atmospheric pressure chemical ionization	MP2	<i>engl.: second order Møller Plesset</i>
Aq. dest.	destilliertes Wasser (<i>lat.: aqua destillata</i>)	MS	Massenspektrometer
AS	Aminosäure	m/z	Masse pro Ladung
°C	Grad Celsius	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
cal	Kalorien	OC	Osteocalcin
CP	Calciumphosphat	OCP	Octacalciumphosphat
Da	Dalton	Pa	Pascal
DCPD	Dicalciumphosphatdihydrat (Brushit)	P _i	anorganisches Phosphat (<i>engl.: inorganic phosphate</i>)
DPPC	Phospholipid 1,2-bis(palmitoyl)-glycero-3- phosphocholine	ppm	Teile von einer Million (<i>engl.: parts per million</i>)
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie (<i>engl. energy-dispersive X-ray</i>)	P-Ser	Phosphoserin
ESI-MS	Electron Spray Ionization-Massenspektroskopie	PS	Phosphoserin
et al.	und andere (<i>lat.: et alii</i>)	Q	Ladung
EtOH	Ethanol	REM	Rasterelektronenmikroskop
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie	(s)	fest (solid), Phasenangabe
×	bei Zentrifugation: vielfaches der Erdanziehungskraft, z. B. 1000×	SAXS	Kleinwinkel Röntgenstreuung
(g)	gasförmig, Phasenangabe	SBF	simulierte Körperflüssigkeit (<i>engl.: simulated body fluid</i>)
ges	gesamt	Ser	Serin
g	Gramm	sim	Computersimulation
Gp	Gruppe	Si-Waver	Silizium Waver
HAp	Hydroxylapatit	S	Siemens (el. Leitfähigkeit)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	s	Sekunde(n)
J	Joule	s. S.	siehe Seite
K	Kelvin	TetCP	Tetracalciumphosphat
(l)	flüssig (liquid), Phasenangabe	TEM	Transmissionselektronenmikroskop
l	Liter	UpM	Umdrehung pro Minute
Lsg	Lösung	UV/vis	ultravioletter (UV) und sichtbarer (<i>engl.: visible</i>) Bereich des elektromagnetischen Spektrums
		v. d. W	van der Waals
		V	Volt
		XRD	Röntgendiffraktometrie

Vorwort

Diese Arbeit richtet sich an chemisch oder biochemisch vorgebildeten Leser (z. B. Studenten nach dem Vordiplom) und behandelt die Wechselwirkung von Calciumphosphat mit ausgesuchten Molekülen. Sie soll einen Beitrag zur Klärung der Vorgänge in der Biomineralisation leisten und ist im Bereich der Grundlagenforschung angesiedelt. Finanziert wurde diese Arbeit durch die DFG (Deutsche Forschungs-Gemeinschaft, SPP 1117, „Prinzipien der Biomineralisation“). Die Ergebnisse sollen bei der Entwicklung calciumphosphathaltiger Biomaterialien helfen, den Kontakt zwischen dem Mineral und organischer Matrix besser zu verstehen und gegebenenfalls gezielter beeinflussen zu können.

Auf Grund des interdisziplinären Charakters dieser Arbeit gibt es viele Begriffe, die einer näheren Erläuterung bedürfen. Um eine möglichst gute Lesbarkeit zu erreichen, wurden viele Anmerkungen und Erläuterungen in den Anhang, meist in das Glossar gesetzt. Begriffe, die im Glossar erläutert sind, wurden serifenlos dargestellt (**Glossar** ab Seite 174). Das Glossar enthält außer den erläuterten Fachbegriffen auch die genaue Bezeichnung der verwendeten speziellen Verbrauchsmaterialien sowie die Bezeichnung der verwendeten Messgeräte. In der PDF-Version dieser Arbeit sind alle Verweise mittels Mausklick zu erreichen (verlinkt).

Zusammenfassung

Der hierarchisch strukturierte und hoch geordnete Aufbau von Calciumphosphat und Kollagen in Knochen und Zähnen wird von den Zellen mit Hilfe bestimmter Moleküle erreicht. Diese organischen Moleküle, zumeist Proteine, beeinflussen durch die räumliche Anordnung ihrer Ladung das Präzipitations- und Wachstumsverhalten der mineralischen Phase.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Computersimulationen zeigen, dass ein Calciumphosphatkomplex mit deprotoniertem Phosphat am stabilsten ist. Vermutlich nimmt die Bindungsenergie pro Oberfläche des Komplexes mit wachsender Größe bis zu einem $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ -Komplex (Posner Klaster) linear zu. Die Präzipitation von Calciumphosphat aus wässriger Lösung führt häufig zu amorphen Kugeln mit 50-500 nm Durchmesser, die sphärische Unterstrukturen von ca. 5 nm Durchmesser zeigen und bei großer Dichte zu einer amorphen Schicht verschmelzen. Geringe Unterschiede in der Präparation können aber schon zu stäbchenförmigen oder plättchenartigen Kristalliten führen.

Phosphoserin ist eine der wichtigsten Aminosäuren bei der Anbindung von Proteinen an Calciumphosphat. Das Computermodell zeigt an der gesamten Oberfläche dieser Aminosäure ein deutliches elektrisches Potential, dies begünstigt die Wechselwirkung mit Ionen. FT-IR- und NMR-Untersuchungen zeigen, dass Phosphoserin bei Kopräzipitation mit Calciumphosphat höchstwahrscheinlich in die mineralische Phase eingebaut wird. Serin zeigt bei der Kopräzipitation ab 1 mM einen Einfluss auf die Morphologie von Calciumphosphat, während Phosphoserin schon bei 0,01 mM einen deutlichen Einfluss zeigt. Elektronenspray-Ionisations Massenspektroskopie (ESI-MS) bestätigt die relativ zum Serin intensivere Wechselwirkung von Phosphoserin mit Calciumphosphat.

Das wichtigste Protein zur Vermeidung ektopischer Mineralisierung ist Fetuin. Dieses Protein stabilisiert die transient auftretenden amorphen Calciumphosphatkugeln (ACP-Kugeln) und erlaubt so dem Körper deren Entsorgung [217, 119]. Fetuin verhindert das Verschmelzen von ACP-Kugeln, wenn diese in großer Dichte auftreten, wobei deren feine Unterstruktur erhalten bleibt. Trotz des starken inhibitorischen Verhaltens wird das Auflösen von Brushit durch die Anwesenheit von Fetuin praktisch nicht beschleunigt. Auch auf die Kinetik der Assemblierung von Kollagen zeigt Fetuin praktisch keinen Einfluss.

Des Weiteren wurde das Nukleationsverhalten des häufigsten, nichtkollagenen Knochenproteins, dem Osteocalcin (OC), mittels ESI-MS beobachtet. Die Untersuchungen von Osteocalcin in Calciumphosphatlösung zeigten Komplexe mit bis zu 8 Ca^{2+} , der größte identifizierbare Komplex bestand aus $[\text{OC Ca}_2 (\text{PO}_4)_2 \text{Na}_4]^+$.

Um die Mineralisierung von Kollagen genauer zu untersuchen, wurden assemblierte Kollagenfibrillen in der Flüssigzelle eines Atomkraftmikroskops (AFM) mit Calciumphosphat nachmineralisiert. Hierbei wurde eine gleichmäßige Anlagerung der offenbar amorphen mineralischen Phase beobachtet. Die Inkubation der Fibrillen mit Phospholipidvesikeln führte zu einem Aufweichen der Fibrillen.

Des Weiteren wurden Phospholipidvesikel hergestellt, um den Calciumphosphatniederschlag in einem räumlich stark begrenzten Abschnitt zu untersuchen. Die Vesikel wurden mit REM und AFM abgebildet und so verschiedene Präparationsmethoden verglichen. Es konnten plättchenförmige Kristallite an der Vesikelmembran gezüchtet werden, während bei Anwesenheit von Phosphoserin globuläre Objekte auftraten.

Eine Arbeitshypothese wurde entwickelt, die das unterschiedliche Wachstumsverhalten von Calciumphosphat in wässriger Lösung mit einer positiv geladenen Hydrathülle um den Calciumphosphatkeim erklärt. Die Protonen stammen vom deprotonierten Phosphat des Mineralkeims und können sich auf Grund der adsorbierten Wassermoleküle nicht sofort in der Lösung verteilen. Diese Hülle aus H_3O^+ verhindert das beliebige Anlagern von Ionen an den Mineralkeim und lenkt so dessen Morphologie.

Abstract

The precipitation and dissolution of calcium phosphate in the body of many mammals is controlled by the electrostatic potential and sterical organization of special molecules, mostly proteins. To understand and utilize these processes, calcium phosphate was precipitated in the presence of phosphoserine, osteocalcine, fetuin, collagen as well as in phospholipid vesicles, as these are the most important tools of the human body to control this mineral phase. The samples were examined by AFM, SEM, FT-IR, UV-Vis, ESI-MS, NMR and XRD and the calcium phosphate nucleation was modeled by means of *ab initio* computer simulations.

The computer simulations show the deprotonated phosphate to be the most stable counterion for Ca^{2+} as compared with protonated phosphates. The binding energy per surface rises linearly with the growing calcium phosphate complex up to $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (Posener cluster). When precipitated from an aqueous solution, calcium phosphate aggregates often to spheres

of 50-500 nm diameter (ACP-spheres) showing a spherical substructure of ca. 5 nm diameter. A high density of these ACP-spheres causes fusion to an amorphous layer when the salt is precipitated and dried. Even small changes in the precipitation environment (like pH or small amounts of additional salts) can lead to a completely different morphology of calcium phosphate phase (like needles or platelets).

As phosphoserine often interfaces the interaction of proteins with calcium phosphate, a closer look was taken at its interaction with this salt. The computer model shows a prominent electrostatic potential throughout the whole amino acid, implying good interaction with ions. Examinations by NMR and FT-IR reveal that all functional groups were involved in binding, when precipitated with calcium phosphate. Most likely, it is embedded within the mineral phase. The precipitation of calcium phosphate in the presence of serine shows no pronounced effect until the concentration of the amino acid has risen to 1 mM. In contrast, a concentration of 0,01 mM phosphoserine results in a clearly smaller and less structured morphology of calcium phosphate. ESI-MS experiments confirm the stronger interaction of phosphoserine as compared to serine.

The coalescence of ACP-spheres is prevented in the presence of fetuin while the substructure of these spheres is preserved. The dissolution of brushite in an fetuin-TRIS buffer is not accelerated over a plain TRIS buffer. Fetuin shows also no major effect on the assembly speed of collagen fibrils.

Osteocalcine is the next most abundant protein in bone after collagen, therefore its potential to form a complex with this salt was examined by ESI-MS. The largest complex observed was a $[\text{OC Ca}_2 (\text{PO}_4)_2 \text{Na}_4]^+$.

The potential of collagen to serve as template in the formation of calcium phosphate minerals was tested and observed by atomic force microscopy (AFM). The the mineral phase was precipitated in various ways on the fibrils, forming an amorphous coat. Crystallites were not observed. In addition, the collagen fibrils were incubated with a solution containing phospholipid vesicles. In the AFM, the image of the fibrils became fuzzy, but the position and their general longitudinal shape were unchanged.

It is also presumed, that phospholipid vesicles play a crucial role in the transport of calcium phosphate before the mineralization process. Therefore, phospholipid vesicles were prepared in different ways, and calcium phosphate was precipitated therein and depicted by AFM and SEM. Small platelets with a sexangular shape (implying a hexagonal or trigonal crystal system) were observed, which become globular when phosphoserine is added.

The working hypotheses suggested claims, that the morphology of a mineral deposit can be governed by a positively charged hydration shell. The protons derive from the phosphate of the first precipitation. They diffuse slowly through the adsorbed water molecules, leading to a high presence of H_3O^+ . The mineral nucleation starts out randomly, but is controlled when the mineral phase exceeds a certain size.

1 Einführung

1.1	Biomineralisation	1
1.1.1	Knochen	2
1.1.2	Molekulare Mechanismen	4
1.2	Calciumphosphat	6
1.2.1	Ionenannäherung	7
1.2.2	Entstehung der Calciumphosphat-Nanokugeln	7
1.2.3	Entwicklung der ACP-Nanokugeln	8
1.2.4	Lösen von Calciumphosphat	10
1.3	Phosphoserin	10
1.4	Kollagen	11
1.5	Osteocalcin	12
1.6	Fetuin	13
1.7	Matrixvesikel	14
1.8	Fragestellung der Dissertation	16

1.1 Biomineralisation

Viele Lebewesen nutzen die physikalischen und chemischen Eigenschaften von anorganischen Kristallen, um verschiedene, für den Organismus wichtige Aufgaben zu erfüllen. Dabei werden die Härte von Kristallen zum Aufbau schützender Schalen und die Steifigkeit als stützende Funktion im Skelett oder in den Zähnen genutzt. Die großen Mengen eines Salzes in diesen biologisch verwendeten Strukturen dienen zudem als Ionenreservoir für den Stoffwechsel und als Puffer für den pH-Wert. Werden Minerale bei ihrem Aufbau von Lebewesen beeinflusst oder zum Vorteil derselben verwendet, bezeichnet man die Minerale als Biominerale. Meistens liegen diese in einer kristallinen Phase vor, eine Erweiterung des Begriffs der Biomineralisation über die amorphe Phase ist im Allgemeinen sinnvoll. In der Natur wird durch Zellen ein räumlich und zeitlich begrenzter Bereich so beeinflusst, dass für den Kristallbaustein ein lokales Energieminimum an der Stelle entsteht, an der der Baustein mit seinen spezifischen Eigenschaften seinen Zweck erfüllt. Die wichtigsten Kräfte hierbei sind H-Brücken, Ionenbindung, hydrophobe Interaktion, van der Waals- und wasservermittelte Brückenbindung [276]. Die Gründe, weshalb es trotz jahrelangem Bemühen vieler Forscher bis heute nicht gelungen ist, die natürlichen Materialien in vergleichbarer Qualität im Labor herzustellen, ist die enorme Komplexität, die durch den Einfluss aller chemisch und physikalisch relevanter Parameter entsteht, sowie die relativ geringen Energieunterschiede, die darüber entscheiden, ob ein Kristall entsteht und, falls ja, welche Phase und welcher Habitus diesen dominieren.

Von der biologischen Seite aus betrachtet, ist der Auf-, Ab- und Umbau eines Biominerals das Ergebnis des komplexen Zusammenspiels vieler regulatorischer Faktoren, die man, um die Komplexität darzustellen, analog zum Metabolismus auch als *Krystallismus* (griech.: *κρυσταλλωσ*) zusammenfassen könnte. Typische Fragen, die bei der Untersuchung mineralbildender Organismen immer wieder gestellt werden, sind:

1. Welche Gene spielen bei der Biomineralisation eine Rolle?
2. Welche Produkte des Stoffwechsels werden für die Kontrolle über die kristalline Phase benötigt, und wie arbeiten diese?
3. Wie wechselwirken die relevanten Proteine mit der kristallinen Phase?
4. Woher kommen die Bausteine der Biomineralien und was passiert mit ihnen, wenn der Kristall nicht mehr gebraucht wird?

Die Antworten darauf fallen sehr unterschiedlich aus und sind, soweit bekannt, in der umfangreichen Literatur, die unter dem Stichwort “Biomineralisation” zu finden ist, gegeben (zum Beispiel [12]). Diese Arbeit behandelt Ausschnitte der dritten Frage. Für den Menschen ist vor allem Calciumphosphat als anorganischer Bestandteil wichtig, da dieses Mineral als stützender Bestandteil in Zähnen und Knochen Anwendung findet, und diese Organe gleichzeitig als Mineralspeicher für Ca^{2+} und P_i . Die zahlreichen Anwendungsbeispiele für die Erkenntnisse aus der Biomineralisationsforschung sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

1.1.1 Knochen

Die Knochenmatrix setzt sich zu 10% aus Wasser, zu 20% aus organischen Materialien (Kollagen Typ I, Osteonectin, Osteocalcin, Proteoglycane) und zu 70% aus anorganischen Stoffen (vor allem Hydroxylapatit) zusammen. Dabei zeigt der Knochen, wie XRD- und SAXS-Untersuchungen belegen, bis zur μm -Skala regelmäßige Strukturen [179] und besitzt deshalb eine Kombination aus interessanten Eigenschaften wie Stabilität (Elastizitätsmodul von Knochen bis 32 GPa), Leichtigkeit (Dichte bei geg. Stabilität: $1,7\text{--}2 \text{ g cm}^{-3}$), Reparierbarkeit und zellbiologischer Verträglichkeit. Aus diesen Gründen ist es auch erstrebenswert, ein solches Material nachzubauen und für weitere Anwendungen zu modifizieren, zumal die Rohstoffe günstig und in großer Menge verfügbar sind. Die Entwicklung der Minerale im Knochen folgt in weiten Bereichen chemischen-physikalischen Gesetzen und wird nur teilweise durch die von Zellen geschaffene Mikroumgebung gelenkt [26]. In der Wachstumsphase kann der Entstehungsprozess von Röhren- und Schädelknochen zweistufig beschrieben werden: In der ersten Stufe findet in der **Epiphysenfuge** des Knochens, die größtenteils aus kleinen losen Kollagenfibrillen (ca. 20 nm Durchmesser) besteht, an der **Proteoglycanmatrix** eine schnelle, 70%ige Mineralisierung statt [74]. Vermutlich liefern Vesikel in diesem Bereich die Ca^{2+} - und P_i - Ionen [189]. In der zweiten Stufe kommt es zu einem Umbau des schnell mineralisierten Knochens zu **Osteonen** durch Osteoklasten und Osteoblasten. Die Größe der Calciumphosphatkristallite im Knochen wächst von $2 \times 6 \text{ nm}$ (bovin, postnatal) [70, 74] zu Maximalwerten von $15 \text{ nm} \times 200 \text{ nm}$ [176]. Bis die letzten 30% mineralisiert sind vergehen

Tabelle 1.1: Motivation für die Untersuchung der einzelnen Aspekte der Calciumphosphat(bio)mineralisation

Forschungsthema	Anwendungsbeispiel
Ein genaues Verständnis des Mineralisierungsvorganges auf zellbiologischer Ebene	Herstellung möglichst natürlicher Knochenersatzmaterialien, Zellkultur als realistisches Modell für medizinische Forschung [208]
Calciumphosphat-lösende/komplexierende Moleküle	Verhindern ektopischer Mineralisierung (z.B. in den Blutgefäßen und Herzklappen), „Calciumphosphat-Antikörper“ [3]
Chemisch-physikalisches Verständnis für den Einbau von Fremdionen	Ausfällen von calciumphosphathaltigen Salzen zum Reinigen von Klärwässern
Wechselwirkung von Calciumphosphat-Oberflächen im Körper	Beschichtung von Implantaten
Ausfällen von Apatit in Nanoporen und Rehabilitation von Mineraldefekten	Zahnpasta und Mundspülung, die Zähne reparieren
Resorptionsverhalten von Calciumphosphatbeschichtungen und Salzen	Calciumphosphat als stationäre Phase in der Chromatographie
Adsorption von DNA an Calciumphosphat-Nanokugeln	zur Transfektion von Zellen
Aufbau komplexer Nanostrukturen in moderater Umgebung (wässrige Lösung, neutraler pH, Raumtemperatur) im <i>bottom up</i> -Verfahren	Herstellung günstiger technischer Produkte mit Strukturierung auf der nano-Skala
Wechselwirkung von funktionellen Gruppen und Biomolekülen mit Ionen (Komplexbildungen) und Kristalliten <i>in vitro</i>	richtige Interpretation der komplexen Ergebnisse aus der <i>in vivo</i> -Forschung
Entwickeln einer Calciumphosphat-Mikrotiterplatte ^a , die Zellen eine „knochenartige“ Umgebung bietet	Proliferation von Stammzellen <i>in vitro</i>

^aEin kleines Tablett mit vielen Vertiefungen die als Reaktionsräume dienen.

im Allgemeinen Jahre. Der Anteil des Wassers im Knochen sinkt dabei von 27% auf 13% [7]. Die Kristallite in den Osteonen sind aufgefächert, allerdings schwankt ihre c-Achse dabei durchschnittlich um $\pm 15^\circ$ [255]. Im Knochen findet erst die Fibrillogenese, dann die Mineralisierung statt. Die Ausrichtung der Kristallite wird durch das Kollagen vorgegeben, dabei kann die amorphe Calciumphosphatphase eine Nahordnung bis 3 nm aufweisen [176]. Höchstwahrscheinlich kommt es im Rahmen der Reifung zu einer Umwandlung des zunächst gebildeten OCP (Octacalciumphosphat) zu HAp [50, 38].

Der Knochen ist nicht gleichmäßig mineralisiert, was einem Risswachstum entgegenwirkt. Die Kristallite bestehen aus schlecht kristallinem HAp, dessen stärkste Reflexion die [002]-Ebene ist. Häufig werden Ionen ersetzt, vor allem wird OH^- durch Cl^- oder F^- ausgetauscht, aber auch ein Ersatz von Ca^{2+} durch Mg^{2+} ist möglich. Auch Lipide wurden im Knochen nachgewiesen. Das Kollagen ist durch Lysinaldehyd (Lys), Hydroxylysinaldehyd (Hyl) und Histidinaldehyd vernetzt, dadurch wird die Stabilität weiter erhöht [77]. Die mineralisierten

Kollagenfibrillen sind ca. 100 nm dick, wobei die Kristallite teilweise das Wasser in den Lücken der Fibrillen, den “Gaps”, ersetzen [74].

1.1.2 Molekulare Mechanismen

Zur Herstellung eines Materials, das die Aufgaben des Knochengerüsts übernimmt, müssen die Bestandteile auf molekularer Ebene genau platziert werden. Dies ist zum heutigen Zeitpunkt im Labor nur sehr begrenzt möglich. Hierbei spielen alle wichtigen Arten von Biomolekülen eine Rolle: Proteine dienen als Nukleationspunkt, (Poly)Saccharide als Schablone für die Kristallite und Lipide formen die Membranen der Vesikel und Zellen, an deren Oberfläche die Calciumphosphatkristalle wachsen. Eine Zusammenstellung vieler wichtiger Einflüsse bei der Biomineralisation ist in Tabelle 1.2 zu finden.

Die Wechselwirkung zwischen einem organischen Molekül und der anorganischen Phase ist an bestimmte funktionelle Gruppen der Biomoleküle gebunden, die stärker mit der biomineralischen Phase wechselwirken als die übrigen Moleküle im Organismus. Häufig wird dies durch Phosphat- oder Carboxylgruppen realisiert. So wird berichtet, dass das Entfernen der Phosphatreste von Osteopontin mit einer Phosphatase den inhibitorischen Effekt auf die Präzipitation um den Faktor 40 reduziert [111]. Des Weiteren fördert die Alkalische Phosphatase durch die Spaltung von Pyrophosphat die Mineralisation [151].

Dabei ist die Wechselwirkung eines Biomoleküls häufig an eine bestimmte Kristallfläche gekoppelt; so wirken die meisten Matrixproteine nur auf den (010) und (100) Flächen von HAp [36, 76, 26]. Diese flächenspezifische Wirkung ist eine Folge der definierten Abstände zwischen den Seitenketten einer biologischen Struktur und dem Muster des Elektropotentials an einer bestimmten Kristalloberfläche. Zum Beispiel zeigen ^{31}P - ^{13}C NMR Messungen, dass Glykosaminoglykane (GAG) die primäre Kontaktfläche zwischen der Mineralphase und der organischen Phase sind [264]. Diese schablonenartige Interaktion wird *templating* genannt und funktioniert auch zwischen zwei anorganischen Phasen wie HAp und OCP, wobei meist OCP eine Schablone für HAp ist [2].

Organische Moleküle dienen ferner als Transportmittel der mineralischen Phase zum Ort der Kristallisation, wie das Beispiel der PILPs (polymer-induced liquid-precursor, z. B.: Poly- α -L-aspartat, Molekulargewicht: ca. 6000 Da) zeigt, die einen Komplex mit der mineralischen Phase bilden und als solcher Matrixgewebe mineralisieren [89]. Auch Vesikel dienen zum Transport der anorganischen Phase zu den Orten der Mineralisation (siehe Abschnitt 1.7).

Häufig komplexiert ein Protein eine kleine Menge Ca^{2+} - oder PO_4^{3-} - Ionen. Dies hat zwei typische Auswirkungen: Bei steigender Calciumphosphat-Konzentration wirkt das Protein erst niederschlagshemmend und dann als Nukleationskeim für amorphes Calciumphosphat (ACP) oder einen Calciumphosphatkristallit. Dies wurde für BSA (bovines Serumalbumin) [45, 109, 62] als auch für Osteocalcin [71, 110] nachgewiesen. Ein solcher Effekt ist eher *in vitro* als *in vivo* zu beobachten, da diese Proteine, außer ihrer Wechselwirkung mit Calciumphosphat, auch in die zellbiologischen Abläufe eingreifen. Osteocalcin zum Beispiel inhibiert die Alkalische Phosphataseaktivität und hemmt so eine weitere Präzipitation [159].

Der Einfluss eines organischen Moleküls auf die mineralische Phase hängt in erster Linie von der Stärke der Wechselwirkung ab, die Größe und Komplexität haben einen untergeordneten Einfluss [62]. Dies zeigen auch Versuche mit einer Muschelschale: Mit nur 2% der Proteine der Schale können ihre Struktur und die mechanischen Eigenschaften bestimmt werden [83].

Die verschiedenen Calciumphosphatphasen werden durch Adsorption organischer Moleküle stabilisiert. ACP wird zum Beispiel durch Casein [150] und Fetuin stabilisiert [99], eine Umwandlung in eine kristalline Phase wird deutlich verzögert. In biologischen Systemen dienen Aggregate aus Proteoglykanen (PGA) zur Stabilisierung von ACP und müssen gespalten oder entfernt werden, damit Knorpel mineralisieren kann [193]. Polyglutaminsäure behindert das Konvertieren von OCP zu HAp und stabilisiert die c-Achse von OCP. Auf diese Weise entstehen mit Verzögerung sehr lange, nadelige HAp-Kristalle [16].

Tabelle 1.2: Wichtige physikalische, chemische und biophysikalische Einflüsse bei der Biomineralisation

Werkzeug	Anwendungsart	Beispiel
pH-Kontrolle	Lösen und Ausfällen über die Protonierung der Molekülspezies H_3PO_4 bis PO_4^{3-} oder H_2CO_3 bis CO_3^{2-} kontrollieren	Osteoklasten [171], CaCO_3 mit Polymer [48, 223]
Ionenpumpen in Membranen	Anreichern von Ionen in Vesikeln zur lokalen Übersättigung der Lösung	Coccolithen
Phosphatabspaltung von org. Molekülen	Alkalische Phosphatase spaltet PO_4^{3-} von Biomolekülen ab und erhöht so lokal die P_i Konzentration	im Knochen des Menschen [193, 151]
Vesikel, Buchten	In kleinen, abgeschlossenen Kompartimenten arbeiten (Einbuchtung der Membran)	Coccolithen, Korallen
Phosphoserin, Carboxylgruppen	Anbieten eines Nukleationskeims, indem die gegengleichen Ladungen zu den Ionen des mineralbildenden Salzes exponiert werden	Osteocalcin [71], Amelogenin [221]
Stabilisierung des amorphen Mineralvorläufers	Transport der mineralischen Phase zum Ort der Mineralisierung oder zur Entsorgung	PILP [176], Fetuin [99]
Kollagen, Amelogenin	Organische Gerüstvorlage für die Mineralisierung (Template)	Knochen, Auster, Zahn [167]
Kappenmoleküle	Kristallwachstum in eine bestimmte Richtung verhindern	Osteocalcin [71], Amelogenin [221]
Diffusionsgeschwindigkeit und Richtung	säulenartiges Kristallwachstum entlang der Diffusionsrichtung in Gel/Gelatine	Knorpel, Zahnschmelz [113]
Temperatur	Einfluss auf Kristallinität	[241]

Fortsetzung nächste Seite ...

Werkzeug	Anwendungsart	Beispiel
Konzentration der Ionen	Eine niedrige Ca^{2+} und HPO_4^{2-} Ionenkonzentration führt tendenziell zu einer höheren Kristallinität. Richtungswachstum von Kristallen.	Zahnschmelz Prismen [55, 241]
Ionische Zusätze	Einfluss auf Nukleation, Phase, Habitus und Gleichgewicht	siehe Tabelle 1.3
Mechanische Belastung	Kollagen und Calciumphosphat im Knochen richten sich nach dessen Belastung aus	[75, 141]
Transport	Wassermoleküle und Aminosäuren können den Transport von Ionen und Protonen zum Kristall und vom Kristall weg unterstützen	[271, 273]
Elektrische und Magnetische Felder	geringer Einfluss auf Gitterausrichtung und Ionenpezies	[227]
Konzentration des beeinflussenden Moleküls	Häufiges Schema: geringe Konzentration \rightarrow Molekül wirkt als Nukleationspunkt; mittlere Konzentration \rightarrow Adsorption an Kristallfläche (Habitus des Kristallits verändert sich); hohe Konzentration \rightarrow Einbau in den Kristall/massive Störung des Kristallwachstums	[48, 45, 26]
Zeit	im Knochen: Je älter desto (1) größer die Kristallite; (2) weniger CO_3^{2-} im HAp; (3) Stöchiometrie nähert sich der des reinen HAp an, (4) größer das Verhältnis von Mineral zu Matrix.	[180, 160]
Wasser	Bestandteil des OCP-Gitters und Medium zur Protonenaufnahme während der Calciumphosphatpräzipitation	[271]
Art der Zusammenführung der Lösungen	Calciumphosphat Hanteln in schlauchförmigem Reaktor; schnelles Ausfällen führt bei pH 6,7 zu OCP, langsames zu DCPD (Brushit)	[200, 253]
$\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ Verhältnis	Kristallmorphologie	[114]

1.2 Calciumphosphat

Calciumphosphat ist seit über hundert Jahren aus geologischen [125], landwirtschaftlichen [249] und vor allem aus medizinisch-biologischen Gründen [102] Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Auch wenn seitdem enorme Fortschritte im Verständnis und der Anwendung dieser Stoffgruppe erzielt worden sind, stellen sich auch heute noch Fragen, die uns im Bereich der Grundlagenforschung tätig werden lassen. Im Folgenden soll kurz eine aktuelle Sicht auf die Bildung von Calciumphosphatphasen in wässriger Lösung gegeben werden.

1.2.1 Ionenannäherung

Ein näheres Verständnis des Calciumphosphat Auf- und Umbaus setzt die Kenntnis der Bindungsstärken aller beteiligten Ionen untereinander, sowie deren Wechselwirkung mit dem Wasser voraus. Da die Kristallkeimbildung und dessen Wachstum dynamische Prozesse sind, verändern sich mit der Umgebung der beteiligten Objekte auch die Bindungsenergien zwischen ihnen und es kommt zu vielfältigen Auf- Ab- und Umbauerscheinungen.

Bei der **Biomineralisation** spielen zusätzlich die schwachen und mittelstarken Wechselwirkungen der Biomoleküle eine Rolle. *Jeffrey* hat diese Bindungen in drei Typen unterschiedlicher Stärke eingeteilt [123]:

1. Starke Bindungen (63-167 kJ/mol): Beispielsweise in der Flusssäure $\text{HF} \cdots \text{HF}$
2. Mittlere Bindungen (17-63 kJ/mol): Beispielsweise in Wasser oder in Kohlenhydraten.
3. Schwache Bindungen (< 17 kJ/mol): C-H \cdots O Interaktionen, zum Beispiel in Proteinen.

Ionensalze zeigen im Gegensatz hierzu Bindungsenergien von mehreren hundert Kilojoule pro Mol (zum Beispiel $\text{Na} \cdots \text{Cl}$: 325 kJ/mol [186]).

Ca^{2+} in Wasser. Im Falle des Calciums befinden sich 6-8 Wassermoleküle in der innersten Hydrathülle [187]. Der Abstand zwischen Ca^{2+} und dem Sauerstoff des Wassers ist aufgrund von Computersimulationen [187, 220, 72] und experimentellen Messungen [121] bekannt und liegt zwischen 2,44 und 2,57 Å. In der zweiten Hülle beträgt der Ca-O(-H₂) Abstand etwa 4,5 Å und wird aus 2-3 mal so vielen Wassermolekülen gebildet als die Erste. Die Polarisierung der Wassermoleküle erhöht sich von ca. 3 auf bis zu 3,5 Debye [9]. Die Ladung des Ca^{2+} wird teilweise auf benachbarte Wassermoleküle übertragen [268]. Dabei können Wassermoleküle auch die Schale der Hydrathülle wechseln [115]. Zum Entfernen eines H₂O-Moleküls aus der inneren Hülle werden ca. 55 kJ mol⁻¹ benötigt, nicht viel mehr als eine Wasserstoffbrücke zwischen zwei Wassermolekülen [9].

P_i in Wasser. Die Beweglichkeit der Wassermoleküle ist in der ersten Hydratschicht stark reduziert [272]. Sie setzt sich im Falle des PO_4^{3-} aus 16 H₂O, bei HPO_4^{2-} und H_2PO_4^- aus etwa 20 H₂O zusammen. Die zweite Schicht der Hydrathülle ist nur noch teilweise geordnet [67]. Die Protonierung des Phosphats hängt vom pH-Wert ab, die pKs Werte liegen mit zunehmender Protonierung bei 2,1, 7,2 und 12,7. Dihydrogenphosphat bildet besonders starke H-Bindungen aus, da größere Ladungsübertragung oder Überlappung der Orbitale zwischen den Phosphat O "lone pairs" Orbitalen und den antibindenden O-H Orbitalen des Wassers stattfinden [211]. *Ab initio* Berechnungen mit verschiedenen Modellen zum Abstand P-O im Phosphat in Wasser geben Abstände von 1,567 - 1,705 Å wieder [67, 211, 271], experimentell wurde ein Abstand von 1,55 Å bestimmt. Im Kristallgitter liegt der P-O Abstand zwischen 1,51 Å und 1,57 Å [49].

1.2.2 Entstehung der Calciumphosphat-Nanokugeln

Als erster stabiler Keim bei der homogenen Nukleation von Calciumphosphat in Wasser wird ein $(\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2)_3$ -Komplex (Posner Cluster) angenommen. Mit einer einfachen Hydrathülle

um jedes Ion beträgt dessen Durchmesser 9-10 Å [193, 171, 57]. Als nächst größere Struktur werden ACP-Nanokugeln beschrieben, die eine Unterstruktur aufweisen [174] und einen Minimaldurchmesser 40-200 nm erreichen. Die kritische Keimgröße für Calciumphosphat in reinem Wasser liegt höchstwahrscheinlich zwischen diesen beiden Angaben, deren genaue Größe kann aber bisher nicht festgestellt werden.

Die Präsenz anderer Ionen verhindert nicht die Entstehung dieser ACP-Kugeln, wie ihr Auftreten in SBF (simulated body fluid) zeigt [55]. Dass jedoch Fremdionen nicht ohne Einfluss auf eine wachsende Calciumphosphatphase sind, wurde bereits an vielen Stellen beschrieben (siehe Tabelle 1.3).

ACP-Kugeln weisen je nach Präparation unterschiedliche Eigenschaften wie Größe, Ca/P Verhältnis oder Entstehungsgeschwindigkeit auf. Eine Erwärmung bis 500°C führt zu keiner bedeutenden morphologischen Änderung, der Elektronenstrahl des TEM zerstört sie jedoch [36, 174]. Vermutlich ist der Wassergehalt dieser Kugeln variabel. So werden unter dem TEM den helleren Kugeln ein etwas höherer Wassergehalt zugeschrieben, den dunkleren ein niedrigerer [66].

1.2.3 Entwicklung der ACP-Nanokugeln

Während der Entstehung und Reifung der ACP-Kugeln kommt es zu einem schrittweisen Abfall des pH-Wertes und der Ionenkonzentrationen in der Lösung [52]. Je nach Präparation variieren die Intensität und der zeitliche Rahmen der einzelnen Reaktionsschritte. Die Konzentration der Ionen sinkt häufig in zwei Stufen. Nach einem ersten starken Abfall der Ionenkonzentrationen in der Lösung sinkt die Ca^{2+} -Konzentration stärker als die Phosphatkonzentration und es kommt zu einem Anstieg des Ca/P-Verhältnisses im Präzipitat von 1,42 auf 1,57. Begleitet wird dieser Vorgang durch ein Absinken des pH-Wertes. Bei 37°C ist dieser Verlauf 20 mal schneller als bei 20°C [65], und ein zu Beginn erhöhter pH Wert führt zu einer späteren Umwandlung von ACP zu OCP und HAp [161]. Der zeitliche Rahmen dieser Reaktionen liegt für das erste Agglomerat im Bereich von Sekunden bis wenigen Minuten. Ein zweiter pH-Abfall und ein weiteres Absinken der Ionenkonzentrationen findet nach mehreren Minuten (meist 16-200 min) statt. Die weitere Umwandlung in eine kristalline Phase wie OCP oder HAp kann direkt darauf folgen (z.B. nach weiteren 16 min [1] oder 1-6 h [161]) oder sich über Tage [52] bis zu sechs Monaten [1] hinziehen. Der stufenweise fallende pH-Wert während der Präzipitation ist auf die Deprotonierung des Phosphats und auf die Bildung von OH^- in dem ACP-Keim zurückzuführen. Dabei muss in diesem Keim noch genug H_2O vorhanden sein, da ohne Wassermoleküle das Phosphatmonohydrat nicht deprotonieren kann. Ein bleibender Protonenübergang vom Phosphatmonohydrat zum Wasser ist bei einem Abstand zwischen dem Sauerstoff des Wassers und dem Wasserstoff des HPO_4^{2-} von 1,5 Å am wahrscheinlichsten. Die Energiebarriere beträgt dann 50-100 kJ mol⁻¹. Diese Deprotonierung findet höchstwahrscheinlich mit der Anlagerung eines zweiten Ca^{2+} an einen $\text{HPO}_4^{2-} \cdots \text{Ca}^{2+}$ -Komplex statt [271]. In einem magnetischen Feld findet die Kristallformation nur wenig schneller statt; Protonentransfer wird durch das Feld kaum begünstigt [227].

Eine weitere kristalline Phase kann heterogen an ACP nukleieren, ein kleiner Teil der Elementarzelle reicht als Vorgabe für eine Kristallachse aus [1, 158]. Fremdionen können in die Umformung von ACP zu Kristalliten eingreifen. So behindert Mg^{+} die Umwandlung in HAp, während F^{-} diese fördert [171]. Die entstehenden Kristallite sind keineswegs perfekt, sondern bilden erst etwa 6 nm große Parakristalle, die bis 25 nm in Richtung der c-Achse anwachsen [7]. NMR-Untersuchungen zeigen, dass im Falle von nanokristallinem HAp eine amorphe Schicht um die Kristallite bestehen bleibt [118]. Dies gilt nicht nur für *in vitro* ausgefällten HAp, sondern betrifft auch den HAp des Zahnschmelzes. Dort befindet sich eine 0,4 nm dicke, kaum kristalline Schicht um die Kristallite [36]. Das Endprodukt eines Calciumphosphat Niederschlags ist unter physiologisch nahen Bedingungen¹ meist HAp.

Tabelle 1.3: Einfluss ausgesuchter Ionen und Moleküle auf die Calciumphosphatnukleation und das Wachstum des Mineralkeims

Ionen	Art und Weise	Quelle
H^{+}	niedriger pH führt zu Brushit	[148]
H^{+}	niedriger pH führt zur nadeligen Kristalliten	[113]
H^{+}	höhere pH-Werte führen zu späterer Umwandlung von ACP zu OCP und HAp	[148]
$Na_4P_2O_7$	inhibiert ACP-Kugeln größer 25 nm	[66]
OH^{-}	beeinflusst ACP - OCP - HAp Transformationsgeschwindigkeit und die entstehende Phase	[162, 161]
CO_3^{2-}	unterdrückt Wachstum	[113]
CO_3^{2-}	bei CO_3^{2-} in SBF steigt das Ca/P Verhältnis von 1,51 zu 1,63; der CO_3^{2-} -Gehalt steigt im Calciumphosphat von 2,64 auf 4,56 gew. %	[131]
Phosvitin	starke Inhibition bei der Umwandlung zu HAp	[62]
Polyaspartat, Polyglutamat	leichte Inhibition bei der Umwandlung zu HAp	[62]
Citrat, BSA	schwächt Inhibition der Umwandlung zu HAp, reduziert Kristallgröße	[62]
Poly-L-Glutaminsäure	stabilisiert ACP-Kugeln: kleinere Kugeln, die sich zu größeren Komplexen ansammeln	[66]
Proteoglycan-Aggregate	stabilisiert ACP (vermutlich durch Verhindern von HAp-Keimen)	[193]
F^{-}	kein Einfluss	[66]
F^{-}	unterdrückt Wachstum	[113, 129]
Mg^{2+}	kein bedeutender Effekt	[66]
Mg^{2+}	unterdrückt Wachstum	[182, 113]
Mg^{2+} mit ATP	stabilisiert sehr gut ACP in Mitochondrien, ADP und AMP zeigen diesen Effekt nicht	[193, 21]
Mg/Ca	Verhältnis kleiner 0,2 verhindert ACP-Umwandlung	[171]
Ca/P	OCP tritt bei niederen Ca/P auf	[113]
Pyrophosphate & Bisphosphate	behindert die Umwandlung von ACP zu HAp	[193, 151]

¹pH-Wert: 7,4, Osmolarität ca. 300 mosmol/l, Temperatur: 37°C, Druck: 1 bar

1.2.4 Lösen von Calciumphosphat

Das Auflösungsverhalten von Calciumphosphatkristallen kann als Umkehrreaktion des Kristallwachstums betrachtet werden und spielt bei der Umkristallisation der verschiedenen Calciumphosphatphasen eine bedeutende Rolle. Die treibende Kraft beim Auflösen ist der Konzentrationsgradient innerhalb der Nernst'schen Diffusionsschicht oder der Gradient des chemischen Potentials der Ionen. Die Lösungs- oder Wachstumsgeschwindigkeit kann entweder durch die Diffusionsgeschwindigkeit oder die Oberflächennukleation bestimmt werden. Eine Selbstinhibition des Auflösens durch eine Ca^{2+} -reiche Schicht auf dem Kristall und der assoziierten Nernst'schen Diffusionsschicht darüber ist möglich. Durch den Ersatz des sich ablösenden Ca^{2+} durch H^+ kommt es zu einem inkongruenten Lösungsverhalten [56]. Zum Beispiel lösen sich bei DCPD (Brushit) und TetCP erst mehr Ca^{2+} -Ionen, dann kommen die Phosphationen nach. Die Veränderung des pH-Wertes, sowie der unterschiedlich schnelle Anstieg der Konzentration der Calcium- und Phosphationen im Laufe der Zeit zeigen, dass die äußerste Schicht wahrscheinlich erst aus PO_4^{3-} , später aus Ca^{2+} besteht. Als neue, wieder ausgefallte Phase wurde ein schlecht kristalliner HAp mittels XRD nachgewiesen [244]. An der Fest-Flüssig-Grenze bildet sich eine elektrische Doppelschicht, die zeitweise zu 80-90% durch den Sauerstoff des PO_4^{3-} gestellt wird [56]. Zeta-Potentialmessungen zeigen, dass HAp-Partikel an ihrer Oberfläche bei einem pH-Wert > 6 negativ geladen sind und bei pH 11 ein Potential von ca. -25 mV aufweisen [228, 223].

1.3 Phosphoserin

Aminosäuren werden in biologischen Systemen häufig modifiziert, um bestimmte Aufgaben zu erfüllen. Der Aminosäurerest von Serin besteht aus einer $-\text{CH}_2\text{-OH}$ Gruppe, ist jedoch vor allem in Proteinen, die mit Calciumphosphat assoziiert sind, durch eine zusätzliche Phosphatgruppe ergänzt: $-\text{CH}_2\text{-O-PO}_3^{2-}$. Serin ist die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure. In der Biosynthese von Serin ist die Dephosphorylierung des Phosphoserins der letzte Syntheseschritt. Unterbleibt dieser, steht Phosphoserin für die Proteinsynthese zur Verfügung [254, S. 719]. Auch eine Phosphorylierung nach der Proteinsynthese ist möglich. Die phosphoserinhaltigen Proteine wie Osteopontin, Phosvitin oder Casein sind häufig mit Calciumphosphat assoziiert, und werden teilweise direkt im Knochen synthetisiert [86].

Auf Grund der negativ geladenen Phosphatgruppe bindet Phosphoserin besonders gut an Calciumphosphat. So nutzt zum Beispiel das Protein Statherin zwei Phosphoserine an seinem anionischen N-Ende, um an Apatit zu binden [152] und fungiert so als Brücke zwischen organischer und anorganischer Phase [2].

Aus NMR-Messungen ist bekannt, dass das Phosphoserinmolekül in Lösung eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit besitzt und sich begrenzt an seine Umgebung anpassen kann. So dominiert unter pH 8 das trans-Isomer und um pH 8,5 das cis-Isomer. Phosphoserin kann auch den Ionentransport durch Membranen unterstützen [191, 190].

Als Zusatz in Calciumphosphatzementen erschwert Phosphoserin die Auflösung von Trical-

ciumphosphat und Dicalciumphosphat, da die kleineren Kristallite eine höhere Packungsdichte erreichen. Dabei ist die Oberfläche der Calciumphosphate, die unter Zusatz von Phosphoserin gebildet wurden, 1,5 mal grösser als ohne die Aminosäure. Werden auf diesem Zement Osteoblasten kultiviert, zeigt der Zusatz der Aminosäure keinen störenden Einfluss auf die Zellen [206]. Auch zusammen mit Kollagen ist ein mit Phosphoserin modifizierter Calciumphosphatzement für biologische Anwendungen gut geeignet. Tierexperimente zeigen, dass durch die Zugabe von Phosphoserin die Resorption des eingebrachten Materials gesteigert wird [156].

Im Zusammenhang mit Phosphatidylserin spielt die Funktionalisierung des Aminosäurerestes eine wichtige Rolle da, es in Vesikeln einen Komplex mit Calciumphosphat bildet der als Mineralisationskeim dient [243].

1.4 Kollagen

Kollagen ist mit einem Anteil von 30% das häufigste Protein im Menschen und ein wesentlicher Bestandteil von Knochen und Zähnen. Auf Grund seiner enormen Zugfestigkeit dient es vor allem der Stabilisierung von Geweben. Zusätzlich trägt häufig eine Vernetzung zwischen den Fibrillen zur Stabilität bei. Dabei ist der Grad der Vernetzung ein wichtiger Indikator für Stoffwechselkrankheiten und hat einen deutlichen Einfluss auf die Mineralisierung [134]. Vor allem Kollagen Typ I bildet lange, stabile Fibrillen aus Monomeren, dem Tropokollagen. Diese Monomere haben ein Gewicht von etwa 283 300 Da [59], eine Länge von ca. 300 nm und einen Durchmesser von etwa 1,5 nm [235]. Nach der Assemblierung zeigen die Kollagenfibrillen eine typische, sich alle 64-68 nm wiederholende Bänderung (*engl.: D-periodic pattern*). Das Strukturmodell ist allgemein akzeptiert: Die Monomere lagern sich mit ca. 67 nm Versatz übereinander an, während sich in Längsrichtung das nächste Monomer nicht direkt anschließt, sondern eine Lücke von etwa 27 nm freigelassen wird [104, 19, 261]. Der isoelektrische Punkt des Kollagens liegt bei pH 10, ist der pH-Wert niedriger, sind die Fibrillen positiv geladen [6].

Die Mineralisierung von Kollagenfibrillen wird seit vielen Jahren untersucht und kontrovers diskutiert, dennoch herrscht bis heute keine Einstimmigkeit über die Entstehung der starken Mineralisation von Kollagenfibrillen, wie sie im Knochen auftritt. Eine Ursache ist sicherlich die heterogene Beschaffenheit der Knochen. Je nach Art des Knochens, der betrachteten Position innerhalb eines Knochens, seines Alters und der Spezies variiert dessen Aufbau. Im Körper findet die Assemblierung der Fibrillen vor deren Mineralisierung statt [146]. Als initialen Ort des Calciumphosphatniederschlags werden die Vertiefungen in der Bänderung angenommen [146]. Mit fortschreitender Mineralisierung weiten sich die Fibrillen auf [222]. Kristallisiert die anorganische Phase, so folgt die c-Achse der Kristallite der Längsachse der Kollagenfibrillen und schwankt dabei um ca. $\pm 15^\circ$. Viele kleine Kristallite verschmelzen zu größeren, die teilweise durch Stege verbunden sind. Diese Reifung findet im Laufe von Jahren statt [85, 143, 140, 139], danach befinden sich Kristallite sogar in den Ausbuchtungen der Bänderung [13, 234]. Die [001]-Kristallachse wächst am schnellsten und dominiert deshalb in den Kollagenhohlräumen [176].

Die Angaben der Kristallitgrößen in der Literatur schwanken dabei beträchtlich, mit steigendem Alter nimmt die Größe jedoch zu. Die kleinsten Kristallite liegen bei etwa $9 \times 6 \times 2$ nm und wurden aus postnatalem bovinem Knochen gewonnen [250, 70, 74]. Die aus erwachsenen Rindern gewonnenen Kristallite zeigen Ausmaße von etwa $690 \times 770 \times 200$ nm [267]. Die parakristalline Struktur der ersten sich bildenden Kristallite scheint dabei von den funktionellen Gruppen auszugehen. Dies können Carboxylgruppen [46, 130] oder Proteoglykane [204] sein, aber auch Aminosäuren wie Polyaspartate [34] verbessern die HAp-Adsorption an Kollagenfibrillen.

Betrachtet man die zu mineralisierenden Regionen, wie die Epiphysenfuge, scheint dort der Beginn der Mineralisierung nicht weiter biologisch gelenkt zu sein, sondern chemisch-physikalischen Parametern zu folgen [146]. Die mechanischen Eigenschaften des Knochens haben ihre Ursache in der engen Wechselwirkung zwischen den Kollagenfibrillen und Calciumphosphatkristalliten. Erst durch die Mineralisierung erlangt das Kollagen Druckfestigkeit. Ein geschichteter Aufbau und eine ungleichmäßige Mineralisierung wirken dabei einem Risswachstum entgegen [74, 278]. Eine mineralisierte Fibrille von etwa 100 nm Durchmesser bildet einen Grundbaustein aus dem der Knochen zusammengesetzt ist [74]. Häufig befinden sich Kristallite in den Gräben der Bänderung und zwischen den Fibrillen [13]. Diese Wechselwirkung ist bei der Krankheit *Osteogenesis imperfecta* wegen eines Kollagen I Defektes gestört [28].

1.5 Osteocalcin

Osteocalcin ist ein einsträngiges Protein mit einer Masse von ca. 5800 Da. Es ist mit 2% - 5% das häufigste nichtkollagene Knochenprotein und spielt eine wichtige Rolle im Knochenumbau. Es befinden sich dabei 10-40% der Gesamtmenge des sich im Körper befindlichen Osteocalcins im Serum, der Rest ist am Knochen adsorbiert. Im Serum schwankt die Konzentration zwischen 0-500 ng/ml, die normalen Werte liegen bei 5-50 ng/ml [145]. Osteocalcin wird ausschließlich von Osteoblasten produziert und ist einer der besten Marker für die Knochenbildung und ein wichtiger Indikator für Knochenkrankheiten [145].

Trotz der prominenten Rolle im Knochenstoffwechsel beschränken sich die Unterschiede zwischen der Osteocalcin Knockout-Maus und dem Wildtyp im Großen und Ganzen auf einen leicht erhöhten Knochenmatrixgehalt in der knockout-Maus [27]. In Mäusen verhindert Osteocalcin, im Gegensatz zu Fetuin, nicht die ektopische Mineralisierung. Die Wirkung des Proteins scheint auf den Knochen beschränkt zu sein [170].

Auf Grund der engen Verbindung zu Calciumphosphat und zu Kollagen wird das Protein auch in fossilen Knochen über lange Zeiträume gut erhalten, so ist es in über 50 000 Jahre alten Proben (z. B. Bisonknochen) nachweisbar [177]. Der Osteocalcingehalt ist in fossilen Proben umgekehrt proportional zur Kristallinität des Materials: je stärker der Knochen umkristallinisiert ist, desto weniger Protein bleibt erhalten [225].

Die Variation der Struktur und die posttranslationalen Veränderungen zwischen den verschiedenen Wirbeltieren sind bei Osteocalcin sehr gering [145]. Es besteht aus 46-50

Aminosäuren von denen z.B. beim Menschen und beim Rind drei Glutaminsäuren (Glu) zusätzlich carboxyliert wurden (γ -carboxylierte Glu, abgekürzt: Gla) [173]. Die Struktur und die Faltung von Osteocalcin sind aus Röntgen- und NMR-Untersuchungen bekannt: Bei neutralem pH sowie einem stöchiometrischen Verhältnis von Osteocalcin zu Calcium von 1:3 stellt sich eine Tertiärstruktur ein, die aus drei, zu einem Dreieck gefalteten α -Helices besteht, wobei die dritte Helix etwas aufgestellt ist und auf der Ersten aufliegt. Diese sind durch zwei β -Turns verbunden; der N-Terminus des Proteins zeigt keine Sekundärstruktur. Häufig binden dabei bis zu 5 Ca^{2+} an das Osteocalcin [103, 58, 172, 8]. Die Position der γ -carboxylierten Aminosäuren ist durch MS/MS-Untersuchungen bekannt, sie befinden sich alle auf der Außenseite der ersten α -Helix an den Aminosäuren 17, 21 und 24 [128]. Die Abstände zwischen den Gla-Resten betragen zwischen 9 und 13 Å. Als weitere negativ geladene Aminosäuren sind an der zweiten α -Helix auf Position 30 und 34 zwei Asparaginsäuren zu finden (eine Auflistung der Aminosäuresequenz ist auf Seite 168 zu finden).

Bei der Präzipitation aus wässriger Lösung zeigt Osteocalcin einen starken Effekt auf den Habitus von Calciumphosphatkristallen. Statt der meist auftretenden nadeligen Kristalle wachsen in Gegenwart von Osteocalcin flächige Plättchen mit einem Durchmesser bis zu 2 μm . Des Weiteren unterstützt Osteocalcin die Bildung von OCP [71, 82].

Im Zusammenhang mit der Calciumphosphatpräzipitation berichten *Hunter et al.* eine leichte Hämmung der Nukleationsaktivität durch Osteocalcin [110], während *Flade et al.* ein nukleationsförderndes Verhalten beobachten [71].

Während der Kollagenassemblierung reduzieren mehr als 10 μg Osteocalcin pro mg Kollagen deutlich die Fähigkeit von Kollagen Fibrillen auszubilden [82]. Mit einer Gleichgewichtskonstante zwischen 4000-160.000 mol^{-1} bindet es vermutlich im Verhältnis 1:1 zu den Kollagenmonomeren [199].

Des weiteren wurde Osteocalcin als Zusatz in einem Knochenersatzmaterial getestet, welches aus Calciumphosphat-Knochenzement bestand. Die mit Osteocalcin modifizierten Materialien zeigten kleinere HAp-Kristallite als die Materialien ohne Osteocalcin und waren etwas weniger stabil [133]. Im Tierversuch mit Ratten hat die Modifikation mit Osteocalcin zu einer leichten Beschleunigung des Knochenumbaus geführt [202].

1.6 Fetuin

Im Blut liegen die Konzentrationen von Calcium und Phosphat über dem Löslichkeitsprodukt von Hydroxylapatit und Octacalciumphosphat². Da die Ionen allerdings zu einem großen Anteil an Proteinen (z. B. Albumine) adsorbiert sind, ist die Ionenaktivität deutlich geringer als in destilliertem Wasser. Dennoch muss vor allem in Säugetieren eine pathologische Mineralisierung durch Calciumphosphat vom Körper aktiv verhindert werden. Eines der wirksamsten Proteine für diese Aufgabe ist Fetuin (auch AHSG oder α_2 -Heremans Schmidt-Glycoprotein genannt). Dies ist ein globuläres Protein von 48-58 kDa, das in allen bisher untersuchten Säugetieren

²Konzentration im Serum: $[\text{Ca}^{2+}] \sim 1,2 \text{ mM}$; $[\text{P}_i] \sim 1,3 \text{ mM}$; $[\text{OH}^-] \sim 10^{-7} \rightarrow$ errechnetes Löslichkeitsprodukt: $K_{\text{SP}} [\text{Ca}^{2+}]_5 \times [\text{PO}_4^{3-}]_3 \times [\text{OH}^-] = 5,47 \times 10^{-22}$; $K_{\text{SP HAp}} [\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})] = 10^{-53} \text{ M}^9$ [120]

gefunden wurde. Die Fetuinkonzentration im Blut von erwachsenen, gesunden Menschen liegt zwischen 400 und 900 µg/ml [256], wobei es hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Fetuin wird besonders stark in der embryonalen und fetalen Phase exprimiert und spielt wahrscheinlich im mesenchymalen Gewebe eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung [245]. Neben weiteren biologischen Funktionen³ wirkt Fetuin als Antagonist von TGF- β [18] und BMP [51], so verhindert es zum Beispiel die von Cytokinen abhängige Kommunikation von Osteoblasten [240].

Die Bedeutung von Fetuin auf den gesamten Organismus wird beeindruckend durch die Fetuin Knockout-Maus gezeigt, die nach sieben Monaten im gesamten Körper Calciumphosphatablagerungen zeigt [217, 240]. Beim Menschen kann die Fetuinkonzentration im Blut als Marker für arterielle Verkalkung verwendet werden [196]. Da Fetuin sehr gut an Calciumphosphat bindet, reichert es sich im Knochen an [127]. Dabei ist die erste der drei Domänen des Fetuins für die Inhibition der ektopischen Mineralisierung am wichtigsten [218, 96]. Ein Komplex aus Fetuin und Calciumphosphat konnte aus Ratten, die mit Etidronate behandelten wurden gewonnen werden [195]. Dieser enthält 46% Fetuin, 53% Calciumphosphat und in geringen Mengen weitere Proteine [18, 197]. Diese zusätzlichen Proteine unterstützen Fetuin in seiner Wirkung [97]. Es handelt sich um sphärischherische Aggregate die mit einer biphasischen Größenverteilung auftreten und in der Literatur als cpp (calcioprotein particle) [98] oder FMC (fetuin mineral complex) [195] bezeichnet werden. Es wurde gezeigt, dass es zusammen mit anderen Proteinen Komplexe mit Calciumphosphat bildet, und so eine ektopische Ablagerung verhindert wird [197].

Heiss und Schwahn schlagen auf Grund von Neutronenstreuexperimenten einen zweistufigen Wachstumsprozess der Calciumphosphat-Fetuin-Partikel vor. In der ersten Stufe sind die Partikel etwa 50 nm im Durchmesser, dann wächst dieser auf 100 nm an und die Partikel sind so für mindestens 24 h stabil. Es wird angenommen, dass eine dichte, monomolekulare Schicht aus Fetuin das weitere Wachstum der Partikel, sowie das Anwachsen von Kristalliten verhindert [98].

1.7 Matrixvesikel

Extrazelluläre Matrixvesikel spielen bei der Mineralisierung von Knochen und Zähnen eine wichtige Rolle [87, 122]. Verschiedene Untersuchungen geben Hinweise auf den Transport von Calciumphosphat durch Vesikel während der Mineralisierung in der Epiphysenfuge [265, 79, 87]. Allerdings ist die genaue Rolle der Phospholipide bei der Mineralisierung von Kollagen im Knochen noch weitgehend ungeklärt. Ihre Präsenz an Kollagenfibrillen hat allerdings zu dem Vorschlag geführt, dass sie als Bindungsstelle für die mineralische Phase wirken [267]. Die Vesikel mineralisieren dabei vor den Kollagenfibrillen [135]. Des Weiteren werden Kristallite auch in Matrixvesikel antransportiert [188]. Inwieweit Phospholipide und Vesikel für die Mineralisierung verantwortlich sind, oder nur als redundanter Faktor eine Rolle spielen ist nicht genau geklärt [26]. Nachgewiesen ist, dass die Vesikel von den Rändern von hypertrophen

³negatives akute Phase Protein [257], Fetuin inhibiert Insulinrezeptor [47]

Chondrozyten abgeschnürt und nachfolgend ausgeschüttet werden [5, 4, 189]. In den aus Manteldentin gewonnenen Matrixvesikeln zeigen TEM-Aufnahmen von Dünnschnitten nadelige Calciumphosphatkristalle [233]. Vesikel vermitteln teilweise die Kollagenmineralisierung in Sehnen; die Orte der Mineralisierung sind jedoch in den Fibrillen ohne erkennbares Muster verteilt, dies deutet auf chemisch-physikalisch ausgelöste Mineralisierungsereignisse hin [142].

Einen kritischen Blick auf die Rolle von extrazellulären Vesikel bei der Mineralisierung, die sich bei *in vivo*-Untersuchungen stark auf TEM-Untersuchungen stützt, wirft *Ghadially*. Er gibt zu bedenken, dass Calcifizierung nicht nur im Knochen und in den Zähnen auftritt, sondern an vielen unterschiedlichen Stellen im Körper, und dass es bisher noch keine Systematik gibt, in der alle Arten der Calcifizierung erfasst werden können [84].

Aber auch wenn Vesikel nicht primär als Transportmittel für Calciumphosphat dienen, oder nicht der primäre Wachstumsort der Calciumphosphatkristallite sind, zeigt ihr häufiges, mit Biomineralen assoziiertes Auftreten, dass sie dennoch eine wichtige Rolle in der Biomineralisation spielen. Die starke Wechselwirkung zwischen Phospholipiden und Ca^{2+} kann zum Beispiel das Auflösen von Calciumphosphatkristallen verhindern [31]. Im Knochen von Hasen wurden Phospholipid- Ca^{2+} -Komplexe nachgewiesen, die nicht unbedingt in Vesikelform vorliegen und dennoch die Mineralisation der Matrix unterstützen [30, 29]. An Kollagen adsorbierte Kristallite von mehreren 100 nm Größe passen nicht in die Zwischenräume der Kollagenfibrillen. Zwischen Kollagen und Calciumphosphatkristalliten wurde eine Schicht aus Lipoproteinen gefunden, die vermutlich die Mineralisierung vermittelt hat [267].

Phospholipid Doppelmembranen sind bei Raumtemperatur praktisch nicht durchlässig für gelöste Ionen; das dielektrische Feld dieser Membranen verhindert das Passieren der Ionen [37]. Dies ändert sich, wenn die Vesikelmembran in erster Linie aus DPPC aufgebaut wird bei einem Temperaturanstieg über 37°C für Ca^{2+} und zwischen 34°C und 38°C für Phosphat [169]. Dennoch wurden bereits auch unter diesen Temperaturen Calciumphosphatkristallite erfolgreich in künstlichen Vesikeln gezüchtet. Die Erhöhung der Ionenkonzentration in ihrem Inneren erfolgte über Ionophoren [60] oder alkalische Phosphatase-Aktivität [42]. Auch fördern bestimmte Phospholipide, wie Phosphatidylserin [61] die Präzipitation in den Vesikeln.

In Laborversuchen werden die Vesikelmembran durch die Zugabe von verschiedenen Ionophoren für bestimmte Ionen durchlässig gemacht. Carrier-Ionophore binden Ionen, diffundieren durch die Zellmembran und setzen die Ionen auf der anderen Seite einer Membran wieder frei [64]. Dabei durchdringen diese nur Vesikel mit einer einfachen Membran (= Phospholipid-Doppelschicht), multilamellare Membranen werden nicht durchdrungen [215]. Ein typisches, im Zusammenhang mit Calciumphosphat verwendetes Ionophor ist Calcimycin [20].

1.8 Fragestellung der Dissertation

Das entscheidende Zeitfenster bei Entstehung einer festen, mineralischen Phase in wässriger Lösung beginnt mit der Bildung der ersten Ionenkomplexe und endet, wenn die kritische Keimgröße überwunden ist, und das Kristallwachstum nach thermodynamischen Kräften abläuft. Die Größe des ersten stabilen Keimes liegt bei **Calciumphosphat** zwischen 1 und 50 nm. Dieser Bereich ist schwer zu erforschen, da er für *ab initio*-Simulationen zu komplex und die Materialmenge für experimentelle Methoden meist zu klein ist. In der folgenden Arbeit soll der molekulare Ablauf bis zum Niederschlag untersucht werden, dabei wird auch die Rolle des Wassers berücksichtigt, um diese für das Verständnis der Mineralisation wesentliche Lücke zu verkleinern.

Viele Details der Wechselwirkung von **Phosphoserin** mit Calciumphosphat sind noch nicht hinreichend geklärt. So ist unklar, ob Phosphoserin in einen in wässriger Lösung wachsenden Kristall eingebaut wird oder nur an dessen Oberfläche adsorbiert. Auch ist die Frage offen, ob die Aminosäure nur als Startpunkt einer heterogenen Nukleation wirkt oder selbst einen Teil des Kristallkeims darstellt.

Die erste Phase der Nukleation, die Anlagerung von Ca^{2+} an **Osteocalcin**, wurde mittels Electron Spray Ionization-MS [173] und NMR [58, 116, 198, 8] nachgewiesen, die weitere Anlagerung von Phosphat wurde allerdings noch nicht näher untersucht. So ist es beispielsweise unklar, ob sich Osteocalcin nur an vorhandenes Calciumphosphat anlagert und danach dessen Morphologie beeinflusst oder ob es in der Lage ist, einen eigenständigen Keim zu kontrollieren.

Die prominente Rolle von **Fetuin** im Calciumphosphatstoffwechsel führt zu der Frage, welchen Einfluss dieses Protein auf den Knochen hat. Versuche, die die Wechselwirkung von Fetuin mit Kollagen und mit der festen Calciumphosphatphase näher beleuchten, helfen diesen Einfluss genauer zu beschreiben.

Auch wenn es viele Knochenersatzmaterialien aus Calciumphosphat und **Kollagen** gibt [209], ist es bisher keiner Arbeitsgruppe gelungen einen künstlichen Knochen herzustellen, der die mechanischen, physiologischen und strukturellen Eigenschaften des natürlichen menschlichen Knochens hat. Die von *Bradt et al.* entwickelte Methode, eine Lösung mit Phosphatpuffer mit einer Ca^{2+} -haltigen Lösung mit Kollagenmonomeren zu mischen, führt von der Zusammensetzung des Materials nah an den Knochen heran, jedoch fehlt hier der strukturierte Aufbau [34]. Bei dem Versuch, ein solches Material *bottom up* herzustellen, ist es bereits gelungen, Kollagen als strukturierten Film auf Glimmer assemblieren zu lassen und dieses gezielt auszurichten. Allerdings liegen die Schichtdicken im Bereich weniger Nanometer und eine folgende Mineralisierung hat noch nicht statt gefunden [124]. Vielversprechende Ergebnisse, die Mineralisierung von Kollagen zu unterstützen, haben *Ehrlich et al.* durch Anhängen von Glucuronsäure erzielt [68, 69]. Der jedoch auch nach jahrelanger Forschung herrschende große Unterschied zwischen künstlichen und dem biologischen Material zeigt, dass es noch grundlegende Verständnisschwierigkeiten gibt, was den Ablauf und die dominierenden Kräfte während der Mineralisation betrifft: Wie wird die Kristallmorphologie vorgegeben und gelenkt? Wie kommt das Calciumphosphat zum Ort der Mineralisierung? Wie kommt das Calciumphosphat

in die Kollagenfibrille, welche Rolle spielen dabei die beobachteten **Vesikel**? Wie intensiv müssen Proteine mit Calciumphosphat wechselwirken, um einen relevanten Effekt auf die Mineralisierung zu haben? Wo könnte der erste Keim entstehen und wie sieht dieser aus? Wie wird die Ausrichtung des Kristallgitters vorgegeben?

Auch die Hinweise, dass Calciumphosphatkristallite oft mit einer amorphen Schicht überzogen sind [33, 118], zwingen uns, das einfache Templatmodell [2], bei dem der Kristallit einfach nach einem vorgegebene Muster weiterwächst, zu überdenken und weiter zu entwickeln.

Die Untersuchung von Proteinen, die für ihre Wechselwirkung mit Calciumphosphat bekannt sind, soll hier helfen, die relevanten physikalisch-chemischen Parameter, die die Mineralisierung lenken, zu definieren. Erst mit der Kenntnis aller relevanten Einflussgrößen ist es möglich, Materialien, wie sie von der Natur hergestellt werden, nachzubauen und für den Menschen in einem großem Maßstab nutzbar zu machen.

2 Material und Methoden

2.1	Computermodellierung	20
2.2	Chemikalien und Lösungen	24
2.2.1	Calciumphosphat Stammlösung:	24
2.2.2	Züchten von Brushitkristallen	24
2.2.3	Schnelles Einfrieren	25
2.2.4	Phosphorylierung von Serin	26
2.2.5	Vesikel	27
2.3	FT-IR-Messungen	28
2.3.1	KBr-Tabletten	28
2.4	UV/Vis-Messungen	28
2.4.1	Phosphoserin-Konzentration mittels Ninhydrinfärbung	28
2.4.2	Assemblierung von Kollagen mit und ohne Calciumphosphat	29
2.4.3	Kollagen mit Calciumphosphat und Fetuin	30
2.5	Massenspektroskopische Experimente	30
2.5.1	Serin und Phosphoserin in ESI-MS	30
2.5.2	Osteocalcin mittels MALDI-MS	31
2.5.3	Osteocalcin mittels ESI-MS	31
2.6	REM	32
2.6.1	Calciumphosphat	32
2.6.2	Calciumphosphat mit Serin/Phosphoserin	32
2.6.3	Calciumphosphat mit Fetuin	33
2.6.4	Vesikel	34
2.7	TEM	34
2.8	AFM	35
2.8.1	Calciumphosphat	36
2.8.2	Calciumphosphat mit Serin/Phosphoserin	37
2.8.3	Calciumphosphat mit Fetuin	37
2.8.4	Kollagen mit Calciumphosphat	37
2.8.5	Vesikel	39
2.9	NMR	41
2.10	XRD	41

2.1 Computermodellierung

Die Computermodellierung wurde mit der Software *Hyperchem 8* von Hypercube [112] durchgeführt. Es kamen dabei molekularmechanische Berechnungen mit dem Bio+/CHARMM-Kraftfeld und *ab initio*-Berechnungen, basierend auf dem STO-3G Basisset zur Anwendung. Ein größeres Basisset war auf Grund der eingeschränkten Hardware nicht nutzbar. Semiempirische Methoden waren für die Modellierung von calcium- und phosphathaltigen Verbindungen nicht geeignet, da die Parametrisierung auf Kohlenwasserstoffe (Elemente C, H, O, N) optimiert war [231, 232].

Minimalenergie Das Molekül oder der Komplex wurde am Computer gezeichnet oder aus einer vorherigen Rechnung übernommen und modifiziert. Die jeweiligen Ladungen des zu simulierenden Systems wurden jeweils dem Gesamtkomplex zugewiesen und durch eine *ab initio single point*-Berechnung auf dem Komplex verteilt (Einstellung I^a, Tabelle 2.2 auf Seite 23). Diese Methode wurde auch bei molekularmechanischen Berechnungen angewandt. Bei Systemen mit mehr als fünf Atomen wurde vor der *ab initio* Optimierung eine schnelle geometrische Optimierung auf molekularmechanischer Ebene durchgeführt (Einstellungen II, Tabelle 2.2, Seite 23). Die Energie und Ladungsdaten für die Interpretation wurden aus *single point* Berechnung gewonnen, bei der die MP2-Korrelationsenergie mitberechnet wurde. Diese Einstellungen sind in Tabelle 2.2, Einstellung I^b zusammengefasst.

Bindungsenergien Die Berechnung der Bindungsenergien (ΔE) des Wassers an ein Ion oder die zweier Ionen aneinander erfolgte über die Berechnung der Differenz der Gesamtenergien (E_{ges}) der geometrieoptimierten Bindungspartner:

$$\Delta E = E_{ges}[\text{Ion} + (\text{H}_2\text{O})_n] - E_{ges}[\text{Ion} + (\text{H}_2\text{O})_{n-1}] - E_{ges}[\text{H}_2\text{O}].$$

Bei der Berechnung der durchschnittlichen Bindungsenergie wurde die geometrieoptimierte Energie jedes beteiligten Moleküls aufsummiert und von der Gesamtenergie des Komplexes abgezogen. Dieses Ergebnis wurde durch die Anzahl der Bindungen geteilt:

$$\Delta E_{\emptyset} = \frac{E_{ges}[\text{Ion} + (\text{H}_2\text{O})_n] - E_{ges}[\text{Ion}] - (E_{ges}[\text{H}_2\text{O}] \times n)}{\text{Anzahl der Bindungen}}$$

Die Anzahl der Bindungen wurde aus der Darstellung des errechneten Modells abgezählt und ist in Tabelle 4.7 angegeben. Es wurden nur Atomabstände unter 2,5 Å als Bindung in Betracht gezogen (Durchschnittsenergien siehe Abbildung 3.1(b), Bindungsenergien einzelner Wassermoleküle siehe Abbildung 3.1(a)).

Mulliken-Ladungen Die Mulliken-Ladungen, in Tabelle 4.7 angegeben und in Abbildung 3.1(c) dargestellt, sind im Falle des Calciums ein Teil der Ergebnisse der *ab initio*-Berechnungen.

Um die Ladung des Phosphats auf seine Umgebung abzuschätzen, wurden die Ladungen der zugehörigen Sauerstoffatome aufsummiert.

Oberfläche eines Moleküls Die Berechnung der Oberfläche eines Moleküls oder eines Komplexes nach Erreichen des Energieminimums erfolgte mit Hyperchem nach der Methode von *Bodor et al.*; dabei ist der Fehler kleiner 10% [23].

Simulierte IR-Spektren Die simulierten IR-Spektren beruhen auf Molekülen oder Komplexen, die nach der oben beschriebenen *ab initio*-Methode energieoptimiert wurden. Eine *single point*-Berechnung ohne MP2-Korrelationsenergie wurde als letzter Schritt vor der Berechnung der Spektren durchgeführt. Die Berechnung des IR-Spektrums selbst erfolgte über den Aufruf „Vibrationsanalyse“ in Hyperchem und ist im Glossar unter „simulierte IR-Spektren“ genauer beschrieben.

Abschätzung der Energie von Komplexen größer $[\text{Ca}(\text{HPO}_4) \times 2]$ Die Berechnung großer Komplexe benötigt wesentlich mehr Zeit als die kleiner Komplexe. Das aufwendige Suchen der Anordnung der Moleküle in größeren Komplexen, mit der die Minimalenergie errechnet werden kann, entfiel in dieser Arbeit, da deren Konformation aus der Literatur entnommen wurde. Die Komplexe $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$, $\text{Ca}_6[\text{PO}_4]_4$ und $\text{Ca}_9[\text{PO}_4]_6$ wurden aus Publikationen übernommen [126, 155, 251] und mit den oben beschriebenen Einstellungen noch einmal energieoptimiert, da nur die mit der selben Methode gerechneten Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Da die Optimierung dennoch pro Komplex mit den hier gegebenen Mitteln mehrere Wochen gedauert hätte, wurde das Abbruchkriterium von 42 J (= 0,01 kcal) auf 419 J (= 0,1 kcal) $\times \text{mol}^{-1} \times \text{Zyklus}^{-1}$ erhöht. Die Auswirkung dieser Veränderung ist hier am Beispiel eines $\text{CaPO}_4\text{H} \times 2$ Komplexes in Abbildung 2.1 zu sehen. Der Graph zeigt die Gesamtenergie (schwarz) und den Gradienten (blau) bei einer geometrischen Optimierung des Komplexes. Bei einem Abbruchkriterium von 4187 J (1 kcal) lag die Energie nach 43 Rechenzyklen 364 J/mol (= 0,087 kcal/mol) höher als bei einem Gradienten von 42 J (0,01 kcal) und die Rechenzeit betrug etwa ein Viertel, bei einem Abbruchkriterium von 419 J (0,1 kcal) $\times \text{mol}^{-1} \times \text{Zyklus}^{-1}$ lag nach 77 Rechenzyklen die Energie 1,4 J/mol (0,00034 kcal/mol) höher und die Rechenzeit war im Vergleich zum kleinsten Gradienten halbiert. Da der Vergleich der Energien sich auf mehr als 1000 mal größere Energien stützt, ist diese Ungenauigkeit irrelevant für die Argumentation.

Das Modell des Phosphoserins wurde erst molekularmechanisch (Einstellung II), dann mit einer *ab initio*-Berechnung (Einstellung I^a) optimiert. Das Modell des $[(\text{P-Ser Ca})_2 \text{HPO}_4]$ für die simulierten IR-Spektren wurde im Wechsel molekularmechanisch geometrisch optimiert (Einstellung II), gefolgt von einer *ab initio single point*-Berechnung (Einstellung I^a), deren Werte für die Atomladungen in die nächste molekularmechanische Berechnung übernommen wurden. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis eine geometrische Optimierung nach 0 Zyklen erreicht war.

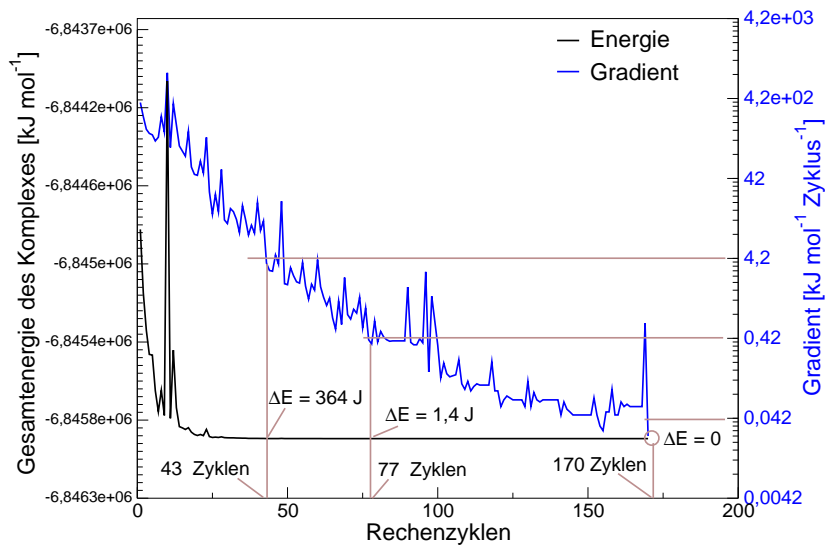


Abbildung 2.1: Veränderung der Gesamtenergie und des Gradienten im Verlauf der geometrischen Optimierung von $[\text{CaPO}_4\text{H}] \times 2$

Tabelle 2.1: Vergleich verschiedener Rechenmethoden bei der Molekül Modellierung

Komplex			Bio+/CHARMM	STO-3G	6-31G**
H₂O					
O-H	Abstand	[Å]	0,957	0,989	0,943
H-O-H	Winkel	[Grad]	104,52°	100,03°	105,97°
Δ E _{ges}	Bindungsenergie	[kJ/mol]	-5,4	-29,4	-42,4
	zweier H ₂ O	[kcal/mol]	-1,3	-7,0	-10,1
Ca²⁺ + H₂O					
Ca-O	Abstand	[Å]	2,826	2,277	2,330
Δ E _{ges}	Bindungsenergie	[kJ/mol]	-1,26	-354,87	-140,78
	eines H ₂ O	[kcal/mol]	-0,30	-84,76	-33,63
HPO₄²⁻					
P-O	Abstand	[Å]	1,479	1,629	1,510
P-O(H)	Abstand	[Å]	1,569	1,805	1,727
O-P-O	Winkel	[Grad]	115°	116°	115,145°
Δ E _{ges}	Bindungsenergie	[kJ/mol]	-28,9	-296,8	-306,1
	eines H ₂ O	[kcal/mol]	-6,9	-70,9	-73,12
[HPO₄Ca]					
Ca-O	Mindestabstand	[Å]	2,572	2,317	2,35
P-Ca	Abstand	[Å]	3,210	2,517	2,487
P-O(Ca)	Abstand	[Å]	1,48	1,644	1,531
P-O(H)	Abstand	[Å]	1,537	1,673	1,586
O-P-O(Ca)	Winkel	[Grad]	111,63°	101,80°	105,75°
Δ E _{ges}	Bindungsenergie	[kJ/mol]	-7,0	-3217,9	-2880,3
	Ca ²⁺ an P _i	[kcal/mol]	-1,68	-768,60	-687,94
[HPO₄Ca] × 2 (gleicher Komplex wie bei simulierten IR-Spektren, siehe Seite 47)					
Ca-O	Mindestabstand	[Å]	2,731	2,347	2,326
P-Ca	Mindestabstand	[Å]	3,359	2,657	2,919
P-O	Abstand	[Å]	1,478	1,628	1,518
P-O(H)	Abstand	[Å]	1,555	1,666	1,594
O-P-O (Ca)	Winkel	[Grad]	113,59°-115,90°	95,65°-105,22°	105,16°-118,96°
Δ E _{ges}	Bindungsenergie	[kJ/mol]	-308,5	-6731,4	-5657,9
	des Gesamtkomplexes	[kcal/mol]	-73,68	-1607,76	-1351,38

Tabelle 2.2: Vorgegebene Parameter für die Computermodellierungen. RMS = root mean square

Parameter	Variable
Einstellung I (<i>ab initio</i> mit STO-3 Basisset)	
Konvergenzlimit	418,7 kJ/mol (100 kcal/mol)
MP2-Korrelation	aus ^a , ein ^b
Ladung des Gesamtsystems	Ca = +2; O an PO ₄ = -1 falls nicht protoniert, dabei mindestens ein O = 0
spin multiplicity	1 oder 2, je nach Komplex
Molekülorbital, Initial Guess	Projected Hückel
Anzahl der d-Orbitale	6
cutoff energy	1 ⁻¹⁰ eV
Integral format	Regular
direct self consistent field	aus
Schritt Algorithmus	Polak-Ribiere
Abschlussbedingung: RMS Gradient	41,9 ^a (0,01 ^a kcal/mol), 418,9 ^b J/mol (0,1 ^b kcal/mol)
Einstellung II (molekularmechanisch mit Bio+/CHARMM-Kraftfeld)	
Kraftfeld Einstellungen:	
Entfernungsabhängige Skalierung	1
elektrostatische Skalierung	1
van d. Waals Skalierung	1
cutoff energy	keine
Schritt Algorithmus	Polak-Ribiere
Abschlussbedingung: RMS Gradient	41,9 J/mol (0,01 kcal/mol)
Einstellung III (<i>ab initio</i> mit 6-311** Basisset, Kontrollrechnungen)	
Konvergenzlimit	418,7 kJ/mol (100 kcal/mol)
MP2 Korrelation	aus
Ladung des Gesamtsystems	Ca = +2; pro O an PO ₄ = -1, falls dieses nicht protoniert ist, bis max. -3
spin multiplicity	1 oder 2, je nach Komplex
Molekülorbital Initial Guess	Projected Hückel
Anzahl der d-Orbitale	6
cutoff energy	1 ⁻¹⁰ eV
Integral format	Regular
direct self consistent field calculation	aus
Schritt Algorithmus	Polak-Ribiere
Abschlussbedingung: RMS Gradient	41,9 ^a J/mol (0,01 ^a kcal/mol), 418,9 ^b J/mol (0,1 ^b kcal/mol)

2.2 Chemikalien und Lösungen

Säuren und Laugen wurden durch Verdünnung der handelsüblichen Chemikalien hergestellt. Die Spezifikationen und Quellen der für diese Arbeit spezifischen Materialien und Geräte sind im Glossar (ab Seite 174) angegeben.

2.2.1 Calciumphosphat Stammlösung:

Calciumhydrogenphosphat Dihydrat $\text{CaH}(\text{PO}_4) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und Dicalcium Dihydrogenphosphat Dihydrat $\text{Ca}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden zu gleichen Teilen in eine mit destiliertem Wasser (Leitfähigkeit $< 18 \text{ k}\Omega$) gefüllte 2 l Flasche gegeben, bis sich ein kleiner Bodensatz gebildet hat. Der pH-Wert von etwa 3 wurde durch Zugabe von $\text{CaH}(\text{PO}_4) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf pH 7,4 angehoben. Nachdem sich das Pulver abgesetzt hat (nach 2-3 Tagen) und sich der pH-Wert nicht mehr änderte, wurde der Überstand der Flasche abgezogen und mit destiliertem Wasser verdünnt, bis eine Leitfähigkeit von $150 \mu\text{S}$ erreicht war. Vor Experimenten mit der Calciumphosphat Stammlösung wurden jeweils pH und Leitfähigkeit gemessen und diese gegebenenfalls durch Zugabe von $\text{CaH}(\text{PO}_4) \times 2 \text{H}_2\text{O}$ oder destiliertem Wasser angepasst. Die Ca^{2+} Konzentration wurde per AAS, die Phosphatkonzentration gravimetrisch bestimmt. Der Begriff „Calciumphosphat Stammlösung“ bezieht sich in dieser Arbeit immer auf diese Lösung.

Tabelle 2.3: Konzentration der Calciumphosphat Stammlösung

	Ca^{2+} [mg/l]	PO_4^{3-} [mg/l]
April 2007	38	114
April 2008	31	117

2.2.2 Züchten von Brushitkristallen

Für die Lösungs- und Wiederausfällungsversuche wurden Brushitkristalle gezüchtet. Dazu wurde eine kleine Kristallisierschale in eine größere gestellt, die innere Schale wurde mit Calciumnitrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,61 M mit 0,01 M HNO_3 auf pH 3), die äußere mit Ammoniumphosphat, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,85 M mit 0,01 M HNO_3 auf pH 3) jeweils bis 2 mm unter dem Rand der inneren Schale gefüllt (siehe Abbildung 2.2). Das innere Volumen betrug etwa 300 ml, das Äußere etwa 350 ml. Vorsichtig, um eine frühzeitige Vermischung zu verhindern, wurde eine 1 cm mächtige Schicht HNO_3 (1 mM) über beide Schalen geschichtet und die Schalen zum Schutz vor Staub abgedeckt. Nach sieben Tagen wurden die größten Kristalle von ca. 5 mm Länge von der Lösungsoberfläche eingesammelt, kurz mit Aq. dest. abgespült und bei 37°C getrocknet. Die Kristallisierschalen wurden in dieser Zeit nicht bewegt [108, 148]. Die größte Fläche ist die (010) Fläche [71], diese wurde auch im AFM abgebildet (gerätespezifische Präparation, siehe 2.8.3).

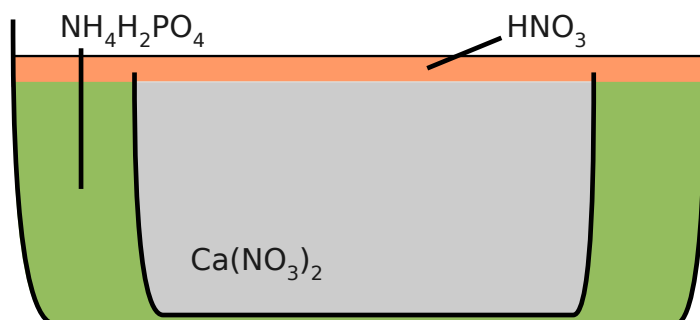


Abbildung 2.2: Züchten von Brushit aus Salzlösungen

2.2.3 Schnelles Einfrieren

Da Proben mit kleinen Strukturen während des Trocknungsvorgangs verändert werden, wurden Proben ähnlich der Beschreibung von *Bearer und Orci* [11] schnell eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Der Begriff „Schockfrieren“ wird hier vermieden, da er einen noch schnelleren und definierteren Einfrierprozess mit Druckveränderung beschreibt [32].

1. Zwei Kupferzylinder wurden in ein Styroporgefäß gegeben.
2. Dieses wurde mit N_2 (l) zu 3/4 aufgefüllt, in einen Exsikkator gestellt und vakuumiert.
3. Das Absaugen der Luft mittels Vakuumpumpe führt zu verstärktem Sieden, nach 1-2 min gefror der Stickstoff.
4. Durch Wiederbelüften taute ein Teil des N (s), die Temperatur des N_2 (l) lag somit bei 63,14 K (-210,01°C), dem Gefrierpunkt von Stickstoff. Der Leidenfrost Effekt wurde dadurch verhindert.
5. Einen Tropfen (3 μ l) Probelösung wurde auf Glimmer oder einen Si-Waver geben und sofort schnell in N_2 (l) eingetaucht und geschwenkt. Da die Probe 193 K (-80°C) nicht überschreiten durfte, wurde sie nicht mehr aus dem N_2 (l) entfernt, bis sie trocken war.
6. Die Probe wurde in eine Einkerbung in der Mitte des Zylinders gelegt.
7. Das gesamte Styroporgefäß wurde über Nacht gefriergetrocknet.
8. Die Probe wurde in einem Trockenschrank bei 37°C aufbewahrt, bis sie untersucht wurde.

Die Temperatur der Kühlwendel des Gefrieretrockners lag bei -40°C. Beim Trocknen der Probe sublimiert das Wasser am kältesten erreichbaren Objekt. Da die Kupferzylinder während des Trockenvorgangs in den ersten Stunden teilweise in N(s) standen, waren sie die kältesten Objekte und das Wasser sublimierte von der Probe an die Zylinder. Nachdem der gesamte Stickstoff verdunstet war, erwärmten sich die Kupferzylinder im Gefrieretrockner und die Kühlwendel wurde zum kältesten Objekt. Auf diese Weise wurde verhindert, dass die Proben zum kältesten Objekt wurden und das Wasser an ihnen sublimiert. Das verwendete Material ist auf Abbildung 2.3 zu sehen. Wurden mehr als drei Proben auf diese Weise eingefroren, wurden die schon gefrorenen Proben in einem mit N_2 (l) gefüllten Aluschiffchen in ein zweites

Gefäß mit N_2 (l) überführt, während im Ersten noch einmal durch Vakuumpumpen N (s) gebildet wurde.



Abbildung 2.3: Utensilien zum schnellen Einfrieren: Kupferzylinder, Messingfuß, Aluschiffchen, Styroporgefäß. Zum Trocknen im Gefriertrockner wurde die Probe in den Spalt in der Mitte des Kupferzylinders gelegt. Der Durchmesser des Styroporgefäßes beträgt 10 cm.

2.2.4 Phosphorylierung von Serin

Markiertes Serin ^{13}C - ^{15}N der Firma Eurisotop (Orsay/Paris, Frankreich) wurde nach Patent 1151810 phosphoryliert [149]. Im Folgenden sind die Syntheseschritte kurz zusammengefasst:

1. 2640 Gewichtsanteile Orthophosphosäure [99%ig, 2244 mg] wurden mit 2640 Gewichtsanteilen Phosphorpentoxyd [2244 mg] gemischt und 4 h auf 95°C erhitzt
2. Die Probe kühlte auf 70°C ab, dann wurden 1000 Gewichtsanteile Serin [850 mg, ^{15}N , ^{13}C] zugeben und weiter für 20 min bei 70°C gerührt; dann langsam auf 95°C erwärmt und 5 min die Temperatur gehalten
3. Die Probe kühlte dann auf 80°C ab, 2050 Gewichtsanteile 2 N HCl [1742,5 mg] wurden zugeben und für 45 min bei 90°C gehalten
4. Nach dem abkühlen auf Kühlschranktemperatur wurde die Probe in einer Lösung aus 14 000 Gewichtsanteilen Aceton [11 900 mg] und 5600 Gewichtsanteilen Ether [4760 mg] aufgenommen
5. Nach sieben Tagen Inkubation wurde die Probe abfiltriert

6. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus 3200 Gewichtsanteilen Wasser [2720 mg] aufgenommen und durch Zugabe von 4500 Gewichtsanteilen Aceton [3825 mg] wieder ausgefällt und abfiltriert
7. Die Probe wurde ein weiteres mal in 4000 Gewichtsanteilen Wasser [3400 mg] aufgenommen und durch Zugabe von 3200 Gewichtsanteilen Ethanol [2720 mg] ausgefällt und abfiltriert

Die Ausbeute betrug 79% (1559 Gewichtsanteile oder 1325 mg), der Reinheitsgrad wurde mittels NMR und FT-IR (s. S. 138) bestimmt und lag bei 99,8%. Für FT-IR-Messungen wurden KBr-Tabletten gepresst (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.2.5 Vesikel

Die Methode zur Herstellung der Vesikel basiert auf der Vorschrift von *Camolezi et al.* [42, 43] und wurde für die verschiedenen Proben weiterentwickelt und angepasst. Im Folgenden sind alle jemals verwendeten Präparationschritte aufgelistet, die jedoch nie alle während einer Präparation realisiert wurden. Die jeweils bei einer Probe tatsächlich angewandten Arbeitsschritte sind mit der Präparation für das Messgerät (meist AFM oder REM) in Tabelle 2.5 angegeben. Im Allgemeinen sind die Vesikel für mehrere Tage stabil [42, 43].

1. Phospholipid Stammlösung: 1 mg DPPC in 1 ml Chloroform lösen
2. Vesikel Stammlösung:
 - (a) 15 µl Phospholipid Stammlösung
 - (b) + 1,5 µg Calcimycin + 1,5 µg Valinomycin (=Ionophoren)
(als Lösung mit 1 mg Ionophoren/ml Chloroform)
 - (c) auf 1500 µl Lösung mit Chloroform auffüllen
3. Vesikel Stammlösung 10 s Vortexen, dann mit N₂ (g) trocken blasen
4. Hinzugeben der Pufferlösung (= Inhalt der Vesikel,
Wasser oder 0,05 M KHPO₄, pH 7,4, bei der Präparation mit angegeben)
5. 10 min bei 47°C inkubieren, Ultraschall (10 s), Vortexen (10 s) → 5 mal wiederholen
6. 10 min Ultraschall (in Wasserbad, mit Eiswürfeln gekühlt)
7. 10 × in N₂ (l) einfrieren und tauen (37°C)
8. Lösung 5 mal durch 0,45 µm Sieb pressen (extrudieren)
9. Zentrifugieren (60 min, 100 000 × g bei 18°C) → Überstand = kleine Vesikel,
Rückstand: Pellet
10. Dialyse 1: gegen 900 ml Aq. dest.
11. Dialyse 2: gegen 900 ml CaCl₂, 0,1 M
12. Verdünnen (meist mit Aq. dest.)

13. schnelles einfrieren/gefrietrocknen
 - (a) auf Si-Waver
 - (b) auf Glimmer
14. Trocknen von 20 µl Vesikellösung bei 37°C
 - (a) auf Si-Waver
 - (b) auf Glimmer
15. Vernetzung mit Glutaraldehyd
16. TEM-Einbettung nach *Spurr* [230] (siehe Seite 34)

2.3 FT-IR-Messungen

Bei FT-IR-Messungen wurde das Spektrum von 400 bis 4000 cm^{-1} (Wellenlänge: 25 - 2,5 µm) mit 512 Scans pro Messung aufgenommen. Von jeder Probe wurde das Spektrum einer leeren Messung aufgenommen und vom Spektrum der Probe abgezogen um die Störsignale zu entfernen. Die Datenverarbeitung erfolgte mit dem Programm **Grace**.

2.3.1 KBr-Tabletten

Das KBr-Pulver sowie die zur Präparation verwendeten Geräte (Spatel, Behälter der Kugelmühle, Kugeln, Presswerkzeug) wurden vor Verwendung mehrere Tage bei 110°C getrocknet um adsorbiertes Wasser zu entfernen. Es wurden 1200 mg KBr mit 3 mg Probe eingewogen und in einer Kugelmühle 90 s lang homogenisiert. Davon wurden aus 200 mg ein Pressling angefertigt, der unter Vakuum für 2 min mit 12 t gepresst wurde. Unmittelbar nach dem Pressen wurde das FT-IR-Spektrum aufgenommen. Die Probenkammer des Geräts wurde dabei laufend mit N_2 (g) gespült um Störungen durch Wasserdampf und CO_2 zu reduzieren. Presslinge ohne Probenpulver dienten als Leermessung.

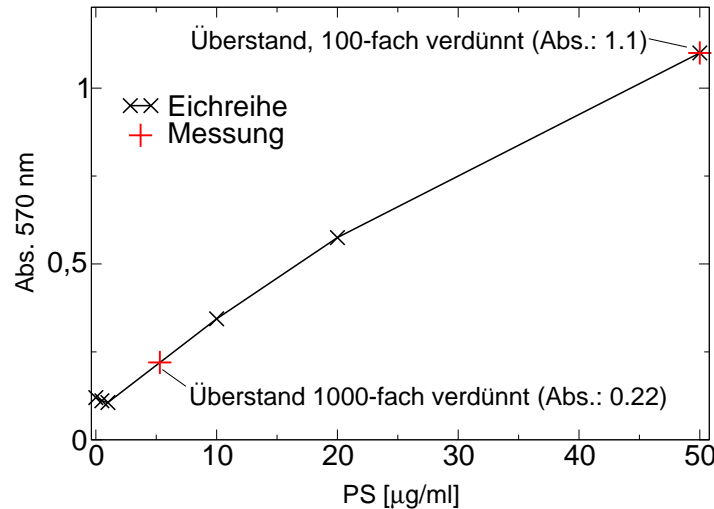
2.4 UV/Vis-Messungen

2.4.1 Phosphoserin-Konzentration mittels Ninhydrinfärbung

Konzentration von Phosphoserin in Lösung wurde mittels Ninhydrinfärbung und Messung der Lichtadsorption bei 570 nm mit einem UV/Vis Spektrometer bestimmt [166, 216, 236]. Die Eichreihe war linear, auch wenn die Lösung Calciumphosphat enthielt. Im Folgenden sind die Präparationsschritte kurz zusammengefasst:

1. Acetatpuffer mit 4 N NaOH und 1 N HCl auf pH 5,3 einstellen
2. 0,2 g Ninhydrin + 0,03 g Hydrindantin in 7,5 ml DMSO lösen
3. Lösung mit N_2 (g) spülen \Rightarrow Ninhydrinlösung
4. 2,5 ml Acetatpuffer 2 min lang mit N_2 (g) spülen
5. 100 µl Probelösung mit 100 µl Ninhydrinlösung mischen

6. Diese Mischung 15 min bei 95°C inkubieren, dann 2 min in Wasserbad bei 0°C kühlen
7. Zugabe von 500 µl einer Lösung aus H₂O:EtOH=1:1, 5 s vortexen
8. Messung der Lichtabsorption bei 570 nm



Abbildungung 2.4: Eichreihe und Probe einer phosphoserinhaltigen Lösung, gemessen mittels Ninhydrinfärbung. In der Probelösung befanden sich 5 mg Phosphoserin pro ml Lösung. Präparation siehe Tabelle 2.6, die Probelösung wurde in dem in Zeile 13 beschriebenen Präparationsschritt entnommen (Überstand nach dem Zentrifugieren).

2.4.2 Assemblierung von Kollagen mit und ohne Calciumphosphat

Die Assemblierung der Kollagenfibrillen wurde nach der Vorschrift von *Bradt et al.* [34] realisiert. Zuerst wurden zwei Lösungen vorbereitet.

Lösung 1: Die gefriergetrockneten Kollagenmonomere wurden mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei 4°C in 10 mM HCl gelöst. Zu 600 µl dieser Kollagenlösung wurden 108 µl Calciumchloridlösung (0,1 M) zugegeben. Sollte im späteren Verlauf der Probenpräparation kein Calciumphosphatniederschlag entstehen, wurde die gleiche Stoffmenge NaCl statt dem calciumhaltigen Salz verwendet.

Lösung 2 (Neutralisationspuffer): Eine Pufferlösung aus 21,6 µl KH₂PO₄/K₂HPO₄ (0,5 M, pH 7,4, Phosphat-Puffer nach Sørensen), 160 µl TRIS (0,5 M, pH 7,4 mit HCl eingestellt), 110 µl NaCl (2 M) und 528 µl Aq. dest. vorbereitet.

Zum Start der Kollagenassemblierung wurden 492 µl Neutralisationspuffer mit der Kollagenlösung gemischt und in ein Wärmebad gegeben. Die Endkonzentration betrug 5,4 mmol/l Phosphat und 9 mmol/l Ca. Nach 24 h bei 37°C wurden die Proben dem Wärmebad entnommen und so die Assemblierung gestoppt. Da assemblierte Kollagenfibrillen das Licht bei 313 nm absorbieren, nicht aber die Monomere, konnte der Fortschritt der Assemblierung im UV/Vis-Spektrometer verfolgt werden. Nach dem Wärmebad lag eine weiße gallertartige Suspension in wässriger Lösung vor (assemblierte Kollagenfibrillen mit Calciumphosphatkristalliten), die für Untersuchungen im AFM oder REM weiterverarbeitet wurden.

Die Herstellung der in der Arbeitsgruppe verwendeten Knochenersatzmaterialien folgt dieser Anleitung, jedoch mit einem Zielvolumen von 2 l (statt der hier beschriebenen 1100 µl). Aus der Suspension werden dann durch Vakuumfiltration **Tapes** oder durch Gefriertrocknen in einem formgebenden Behälter **Scaffolds** hergestellt. Diese können für weitere Experimente (z. B. Zellkultur oder Festigkeitsversuche) verwendet werden.

2.4.3 Kollagen mit Calciumphosphat und Fetuin

Um die Wirkung von Fetuin auf die Assemblierung von Kollagen zu testen, wurde die Assemblierung nach *Bradt* [34] mit 0, 1, 10 oder 100 µg/ml Lösung Fetuin im Phosphatpuffer durchgeführt. Der Einfluss auf die Kinetik ist im UV/Vis-Diagramm in Abbildung 3.26 zu sehen, die Morphologie der Kollagenfibrillen zeigen die AFM-Abbildungen auf Seite 95.

2.5 Massenspektroskopische Experimente

2.5.1 Serin und Phosphoserin in ESI-MS

Die Proben wurden an der TU Dresden am Institut für Organische Chemie auf einem *Bruker Esquire Ion Trap* mit einer ESI/APCI Quelle von Herrn Dr. Bauer gemessen. Diese ESI-MS Messungen wurden unter Zuhilfenahme einer HPLC-Anlage, aber ohne chromatographische Trennung durchgeführt. Man erhält Massenspektren der eingespritzten Probe, das heißt die unfragmentierten Peaks aller enthaltenen Verbindungen, die HPLC-Anlage diente nur als Autosampler. Jede Probe wurde zehn mal ins Massenspektrometer injiziert und bei verschiedenen Spannungen (+10 V, +25 V, +50 V, +75 V, +100 V, -10 V, -25 V, -50 V, -75 V, -100 V) im Fragmentierungsraum gemessen. Man erhält bis zu 10 Massenspektren pro Probe, dargestellt in einem Chromatogramm. Da die Messungen bei negativen Spannungen praktisch keine Signale zeigten (siehe Abschnitt 4) sind nur die ersten fünf Messungen, bei Beschleunigungsspannungen von +10 V bis +100 V dargestellt.

Da die Probe als Auftragsmessung in einer Reihe anderer Proben gemessen wurde, gibt es trotz intensiver Spülvorgänge zwischen den Proben Signale die nicht aus der eingespritzten Präparation stammen. Diese sind meist gut zu erkennen, da ein Massesignal schon vor dem Einspritzen der Probe zu sehen ist. Welche Signale aus diesem Grund verworfen wurden, ist in Tabelle 4.16 angegeben.

Alle Lösungen wurden mit 1N NaOH auf pH 5 angehoben. Ein höherer pH-Wert war nicht möglich, da die Proben auf keinen Fall im Messgerät ausfallen durften. Des Weiteren lag dieser pH-Wert auch während der Präzipitation des Calciumphosphats die für NMR-Messungen vor (siehe Tabelle 2.6, Zeile 10). Zur besseren Ionisierbarkeit wurden die hier gemessenen Lösungen mit 50% Ethanol verdünnt und mit 1% NH₂COOH versetzt. Die gemessenen Lösungen sind in Tabelle 2.4 (Seite 31) aufgelistet.

Tabelle 2.4: Serin und Phosphoserinlösungen im ESI-MS. Tabelle der detektierten Massen, Spek.=Spektrum, Masse gegen im Laufe der Zeit veränderte Spannung.

Probe	Lösung	Tabelle/Spek.
1,1 mg Serin	in 1 ml Wasser (= 10 mmolar)	Seite 161/161
1,0 mg Phosphoserin	in 1 ml Wasser (= 5,4 mmolar)	Seite 162/162
1,0 mg Serin	in 1,5 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 ml H_2O	Seite 163/163
1,7 mg Phosphoserin	in 1,4 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 ml H_2O	Seite 164/164
2,0 mg Serin	in 2 ml Calciumphosphat Stammlösung	Seite 165/165
3,6 mg Phosphoserin	in 2 ml Calciumphosphat Stammlösung	Seite 62/61

2.5.2 Osteocalcin mittels MALDI-MS

Für die Messungen von Osteocalcin mittels MALDI-TOF-MS wurde ein *Biflex IV MALDI-TOF* von Bruker Daltonics des Instituts für Lebensmittelchemie der TU Dresden genutzt. Alle Messungen wurden im Reflexionsmodus von Herrn Dr. Kuckling durchgeführt. Die Probe (10 μg Osteocalcin in 2 mM CaCl_2 ; 0,015 M NaCl ; pH 7,4) und die Matrix wurden auf einen Aluminiumträger (MTP *multi probe adapter target* von Bruker Daltonics, Deutschland) aufgetropft, und mit ^{15}N Laser ($\lambda=337 \text{ nm}$) verdampft. Dabei wurde die Summe von 20 Laserpulsen von jeweils 5 ns gebildet. Zur Kalibrierung diente Polyethylenoxid (PEO) mit einem Molekulargewicht von 2000 g/mol. Als Matrix erzielten 1 mg HCCA in 100 μl TA (= ACN:TFA = 1:2) die besten Ergebnisse wenn diese in Sandwichweise mit der Probe aufgetragen wurden. Dabei wurden nacheinander jeweils 1 μl Matrix, Probe und wieder Matrix aufgetragen, und jeweils etwa 10 min gewartet, bis die vorher aufgetropfte Lösung eingetrocknet war (Massenspektrum siehe Abbildung 3.30).

2.5.3 Osteocalcin mittels ESI-MS

Die ESI-MS Messungen von Osteocalcin in Calciumphosphatlösung fanden am Chemischen Institut der Humboldt Universität zu Berlin statt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Hybrid-NSI IIT FT-ICR Massenspektrometer (*Finnigan LTQ FTMS*, Thermo Electron Co., Bremen) durch Herrn Dr. Andreas Springer. Das Osteocalcin wurde in Lösung bei *Calbiochem* (in 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4, and 75 mM NaCl) und *Biomol* (in 0.01 M TRIS, 0.015 M NaCl , 2 mM CaCl_2 , pH 7,4, 50% Glycerol, gereinigt ($\geq 98\%$ by SDS-PAGE)) gekauft. Vor den Messungen wurde die Osteocalcin Stammlösung gegen Aq. dest. für 12 h dialysiert (2 kDa Membran) und mit den entsprechenden Lösungen (Aq. dest., CaCl_2 (pH 7.4) und Na_2HPO_4 , welches mit HCl auf pH 7.4 gebracht wurde) versetzt. Ameisensäure (COOH) wurde in Mengen zwischen 0.05-0.1% hinzugegeben um die Protonierung zu verbessern und so deutlichere Spektren zu erhalten. NSI Parameter: Sprayvoltage: 1,1 kV; statische nano Nadeln; Kapillarspannung: 40 V, Temperatur: 210°C; optimiert für Tetrapeptid FT-ICR Parameter: Die Massengenauigkeit wurde mit externer Kalibrierung bestimmt: 4 ppm, Auflösung: ca. 100 000 bei m/z 400; Anzahl der eingespritzten Ionen ca. 5×10^5).

Präparation: 1,14 nmol Osteocalcin in 2 μl Aq. dest. wurden nach Zugabe der entsprechenden Menge an Calciumchloridlösung zur Gleichgewichtsbildung 1,5 h stehen gelassen. Im Falle

der gesättigten Calciumphosphatlösung wurde die Lösung 2 h vor Messung mit Osteocalcin vermischt. Direkt vor der Messung wurde 1 μl 0.5% Ameisensäure hinzugegeben, somit hatte die Lösung eine Konzentration von 0.1% Ameisensäure bei der Messung. Die Konzentration des Osteocalcins betrug 1.14 nmol/5 μl . Das Massenspektrum mit Ca-Lösung ist in Abbildung 3.31, das Massenspektrum mit gesättigter Calciumphosphatlösung auf Abbildung 3.32 zu sehen. Die ebenfalls sichtbaren Daten der simulierten Massen wurden mit dem Programm massXpert (Version 2.0.3) erstellt [213].

2.6 REM

Für die Untersuchung der Proben mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die Probe auf einen Si-Waver gegeben und dieser mit Hilfe selbstklebender Kohlenstofffolien auf einen Aluminiumträger aufgeklebt und bei Bedarf mit Leitsilber abgeleitet. Die Proben wurden 10 s lang mit Kohlenstoff bedampft (Baltec MED 010, Bal-Tec GmbH, Deutschland). Es wurde das Rasterelektronenmikroskop des Instituts für Werkstoffwissenschaft, ein DSM 982 Gemini der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Abbildungen wurden mit dem *in lens*-Detektor bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV oder weniger abgerastert. Bei EDX-Messungen wurde die Spannung auf 10-15 kV erhöht.

2.6.1 Calciumphosphat

ACP-Kugeln 3 μl Calciumphosphat Stammlösung wurden auf einen Si-Waver gegeben und bei 37°C eingetrocknet. Danach wurde die Probe für ca. 10 s mit Kohlenstoff bedampft (Abbildung 3.3).

Calciumphosphat-Nadeln Eine Lösung aus 30 ml Calciumphosphat Stammlösung wurden, statt mit CaHPO_4 , mit NaOH auf pH 7,4 angehoben. Davon wurden 3 μl auf einen Si-Waver gegeben und bei Raumtemperatur eingetrocknet (Abbildung 3.5(a)).

Calciumphosphat-Plättchen Zu einer Lösung aus 101 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 4 ml H_2O wurde 614 μl Phosphatpuffer (pH 6,8) gegeben. Der Niederschlag wurde bei $5000 \times g$ für 30 min zentrifugiert, eine Spatelspitze des Rückstands wurde auf einen Si-Waver gegeben und bei 37°C getrocknet (Abbildung 3.5(b)).

2.6.2 Calciumphosphat mit Serin/Phosphoserin

In 10 ml Calciumphosphat Stammlösung wurden 3,7 mg Phosphoserin bzw. 2,1 mg Serin gelöst. Jede Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,4 gebracht. Danach wurden diese Lösungen mit Calciumphosphat Stammlösung auf 20 ml aufgefüllt. Diese in Bezug auf die Aminosäuren 1 mM Lösungen wurden weiter mit der Calciumphosphat Stammlösung verdünnt um Konzentrationen von 0,1 mM und 0,01 mM Phosphoserin zu erhalten. Ein Tropfen von

3 μl wurde auf einen gereinigten Si-Waver und auf einen frisch gespaltenen Glimmer gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet.

- Phosphoserin auf Si-Waver im REM, Abbildung 3.11
- Serin auf Si-Waver im REM, Abbildung 3.10
- Serin auf Si-Waver im AFM, Abbildung 3.12
- Phosphoserin auf Si-Waver im AFM, Abbildung 3.13

Von der für die NMR-Messungen präparierten Probe aus Calciumphosphat und Phosphoserin wurden die elektronenmikroskopische Abbildungen 3.19 angefertigt, Präparation siehe Abschnitt 2.9.

2.6.3 Calciumphosphat mit Fetuin

Fetuin mit Calciumphosphat Es wurde 0,33 μg Fetuin in 1 ml Calciumphosphat Stamm-lösung gelöst, kurz geschüttelt, und jeweils 3 μl davon auf einen gereinigten Si-Waver gegeben. Nach etwa 10 min bei 37°C war die Probe eingetrocknet und wurde für REM-Untersuchungen vorbereitet (siehe Abbildung 3.20(d)), die zweite Probe wurde ohne weitere Behandlung im AFM vermessen (siehe Abbildung 3.20(b)).

Fetuin mit Kollagen Um den Einfluss von Fetuin auf die Kollagenassemblierung abzuschätzen wurden Assemblierungen mit und ohne gleichzeitiger Mineralisation und mit verschiedenen Fetuinkonzentrationen durchgeführt. Der Assemblierungsverlauf wurde mittels UV/vis-Messungen verfolgt. Präparation siehe 2.4.3, REM-Abbildungen von Fetuin mit Kollagen und Calciumphosphat siehe 4.

Fetuin in *Tapes* Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Knochenersatzmaterial (*Tapes*, siehe Seite 29) wurde unter Zusatz von Fetuin hergestellt und im REM betrachtet. Die Herstellung dieser *Tapes* ist identisch mit der unter Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Kollagenassemblierung mit Calciumphosphat. Die Abbildungen der *Tapes* im REM sind auf Seite 96 und 169 zu finden.

Calciumphosphat-Hanteln durch Fetuin Folgende Präparation führte zu der Bildung von Calciumphosphat-Hanteln. Drei Lösungen wurden vorbereitet:

1. Lösung: 50,4 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 30 ml Aq. dest. (pH 8,7)
2. Lösung: 5 mg Fetuin in 2 ml Aq. dest.
3. Lösung: 76,7 mg $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ in 30 ml Aq. dest. (pH 5,7)

Nacheinander wurden 15 ml der Na_2HPO_4 -Lösung, 1 ml der Fetuinlösung und 15 ml CaCl_2 -Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, kurz geschüttelt (pH 6,9) und 20 min bei $5000 \times g$ zentrifugiert. Der Rückstand wurde bei 37°C getrocknet, kurz mit Aq. dest. gespült und noch einmal bei 37°C getrocknet und für das REM präpariert, Aufnahmen siehe Abbildung 3.25.

2.6.4 Vesikel

Alle jemals verwendeten Arbeitsschritte zur Herstellung der Vesikel sind in Abschnitt 2.2.5 aufgezählt. Die bei einer Probenpräparation und nachfolgender Darstellung im REM implementierten Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

2.7 TEM

Die TEM-Aufnahmen wurden am Institut für Werkstoffwissenschaft der TU-Dresden mit einem *EM 912 Omega* der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) von Herrn Dr. Armin Springer angefertigt. Hierzu wurden die Proben nach *Spurr* [230] in Epoxidharz eingebettet und Dünnschnitte angefertigt.

1. Einbetten der Probe in Agarose und mit Osmiumtetroxyd kontrastieren:
 - (a) Probe mit 2% Glutaraldehyd 1:1 mischen und 1 h einwirken lassen (vernetzen)
 - (b) Agarose bis zum Schmelzpunkt erwärmen (50°C) und mit ca. 200 µl Probe 1:1 mischen, rühren, kurz warten bis auf Raumtemperatur abgekühlt
 - (c) Den Anteil der Agarose, der Probe enthält in 1 bis 2 mm große Würfel schneiden
 - (d) in Gläschen (2 ml, mit Schraubverschluß) mit Wasser geben, dazu 2%iges Glutaraldehyd, 1-2 h einwirken lassen
 - (e) Medienwechsel: Lösung mit Glutaraldehyd abziehen und mit 1 ml H₂O + 1 ml OsO₄ ersetzen, über Nacht einwirken lassen
 - (f) 3 x Lösung abziehen und mit H₂O spülen, jeweils 15 min einwirken lassen, um freies OsO₄ zu entfernen
2. Wasserentzug
 - (a) Probe in 1 ml H₂O geben, alle 3 min 3-4 Tropfen Acetonlösung (50%ig) zugeben, so dass nach 30 min Gläschen 2 ml Lösung enthält → 25%ige Acetonlösung
 - (b) 2%ige wässrige Uranylacetatlösung mit 100% wasserfreien Aceton 1:1 mischen (50%ige Acetonlösung), für 15 min inkubieren
 - (c) Lösung abziehen und durch 70%ige Acetonlösung ersetzen, 15 min inkubieren
 - (d) Abziehen, durch 100% Aceton ersetzen, nach 20 min durch frisches Aceton ersetzen, diesen Vorgang 3 mal wiederholen
3. Einbettung in Epoxidharz mit steigendem Harzanteil
(jeweils alte Lösung abziehen und durch gegebene Lösung ersetzen)
 - (a) Harz : Aceton 1:2, 2-4 h einwirken lassen
 - (b) Harz : Aceton 1:1, über Nacht einwirken
 - (c) Harz : Aceton 2:1, 4 h einwirken lassen
(Deckel offen lassen damit Aceton langsam verdunstet)
 - (d) 100 % Harz, 4 h einwirken lassen

- (e) 100 % Harz, über Nacht einwirken lassen
- (f) Harzeinbettung in Silikonformen, Probe in der Spitze der Form positionieren, Harz 48 h oder länger bei 55 - 60°C aushärten lassen (Formen vorher über Nacht bei 60°C von Wasser befreien).

4. Schneiden

- (a) Die Harzblöcke trimmen (anspitzen)
- (b) Dünnschnitte anfertigen: 20-50 nm dick (Ultramikrotom, Leica EM UC6)
- (c) Dünnschnitte auf ein befilmtes Kupfernetz legen
- (d) Filterpapier, mit Aceton getränkt, mit 2 cm Abstand über Harzplättchen schwenken
→ Probe wird gestreckt
- (e) Lufttrocknen

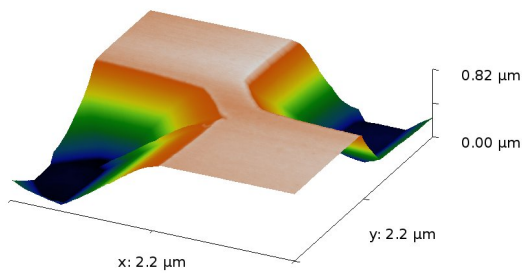
5. Nachkontrastierung mit Uranylacetat:

- (a) einen Tropfen Uranylacetat auf Parafilm geben und Probe 7 min darauf legen
- (b) drei mal mit Wasser spülen (kurz auf Tropfen legen, absaugen mit Filterpapier)
- (c) 30 s auf einen Tropfen Bleicitrat legen
- (d) drei mal mit Wasser spülen
- (e) Wasser mit Filterpapier absaugen → Probe im TEM betrachten

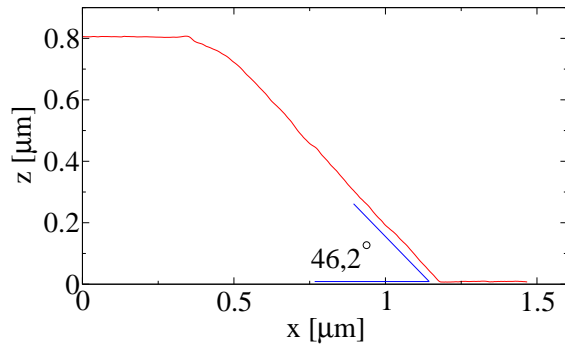
2.8 AFM

Die Abbildungen von AFM-Untersuchungen werden aus einem Datensätzen gewonnen, die eine Eigenschaft der Probe mit einem Ort verbinden. In dieser Arbeit besteht der Ort aus einer zweidimensionalen Fläche von 512×512 Punkten und einer Eigenschaft. Diese ist entweder die Höhe oder die erste Ableitung des Höhenbildes, je nach gesammelten AFM-Datentyp.

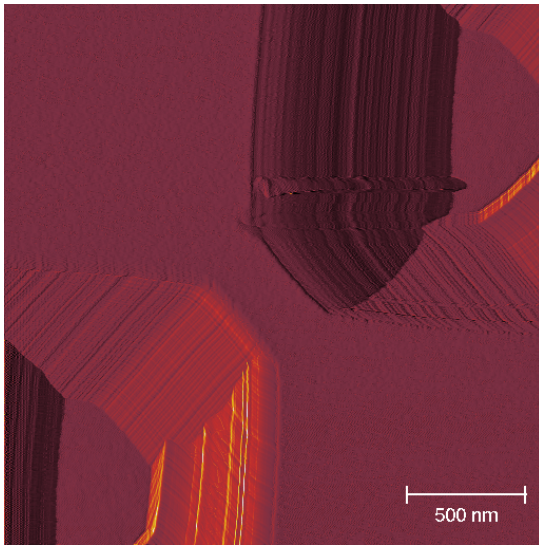
Alle Abbildungen erfolgten mit dem institutseigenen AFM von Digital Instruments (Nanoscope IIIa). Die AFM-Spitzen sind von Micromesh, der Kalibrierungsfehler des AFM liegt bei ca. 5%. Die Proben wurden entweder auf einen gereinigten Si-Waver oder einen frisch gespaltenen Glimmer gegeben. Zur Reinigung wurden die Waver in Piranha-Lösung (Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid 4 : 1) für 3 h inkubiert. Das Säurebad im Becherglas wurde dabei in einem Wasserbad bei 80°C gehalten und alle 20 min für 10 s in ein Ultraschallbad gestellt. Abschließend wurden die Si-Waver intensiv mit Aq. dest. gespült, und mit N₂ (g) getrocknet. Zur Aufbewahrung wurden die Waver in Chloroform eingelagert. Die Genauigkeit der lateralen Auflösung des AFMs wurde mittels einer Teststruktur (TGX01, Mikromesh, siehe Abbildung 2.5) überprüft und ergab in der x-Achse Abweichungen kleiner 1% und in der y-Achse kleiner 6%. Dies liegt im normalen Bereich für das Atomkraftmikroskop.



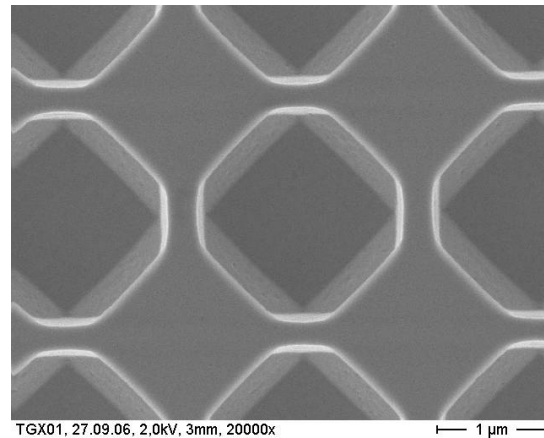
(a) 3d Ansicht



(b) Die Apexwinkel der AFM-Spitze betragen einfallend Richtung: E 46,2°; W 56,3°; S 54,6° und N 56,3°



(c) Das Amplitudenbild gibt die Feinheiten der Oberfläche wieder. Hier geben die schrägen Flächen die Seitenwände der pyramidalen AFM-Spitzen wieder.



(d) REM Nahaufnahme der Teststruktur

Abbildung 2.5: Überprüfung der AFM-Spitze und der Kalibrierung des Geräts

2.8.1 Calciumphosphat

ACP-Kugeln Ein Tropfen von 3 μl Lösung aus der Calciumphosphat Stammlösung wurde auf einem Si-Waver gegeben und bei 37°C eingetrocknet. Die Messung erfolgte trocken im tapping modeTM. Abbildung 3.4 auf Seite 53.

Brushit Ein wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben hergestellter Brushit Einkristall wurde auf einen Si-Waver geklebt und trocken im contact mode abgebildet. Dann wurden ca. 30 μl TRIS Puffer (pH 7,4) in eine Flüssigzelle gegeben und die selbe Stelle noch einmal abgebildet. Zwischen den beiden Abbildungen sind ca. 3 Minuten vergangen. Zwei Stunden lang wurden Abbildungen von dieser Stelle im 20 min Takt genommen. Siehe Abbildung 3.23 Seite 91.

2.8.2 Calciumphosphat mit Serin/Phosphoserin

Die Präparation für die serin- und phosphoserinhaltigen Proben für die AFM-Messungen ist identisch mit der Präparation für die REM-Aufnahmen (Seite 32), nur dass vor den AFM-Messungen keine Beschichtung statt gefunden hat. Die Messungen wurden trocken im tapping modeTM aufgenommen.

2.8.3 Calciumphosphat mit Fetuin

Fetuin mit Calciumphosphat Es wurde 0,33 µg Fetuin in 1 ml Calciumphosphat Stammlösung gelöst, kurz geschüttelt, 3 µl davon auf einen gereinigten Si-Waver gegeben und bei 37°C eingetrocknet. Zum Vergleich wurde ein Tropfen von 3 µl aus der Calciumphosphat Stammlösung ohne Fetuin auf einem Si-Waver gegeben und bei 37°C eingetrocknet (Siehe Abbildung 3.4).

Fetuin auf Brushit Ein Brushitkristall wurde auf einen Si-Waver geklebt und trocken im contact mode abgerastert. Nach Zugabe von TRIS-Puffer (0,5 M, pH 7,4) erfolgten Aufnahmen von der selben Stelle in einem zeitlichen Abstand von 20 min (siehe Abbildungsgruppe 3.23).

Fetuin in Calciumphosphat Stammlösung auf Brushit Es wurde 0,33 µg Fetuin in 1 ml Calciumphosphat Stammlösung gelöst und kurz geschüttelt, 30 µl davon auf einen Brushitkristall gegeben und in einer AFM Flüssigzelle bei 24°C wiederholt abgebildet (siehe Abbildungsgruppe 3.22).

2.8.4 Kollagen mit Calciumphosphat

Kollagenmonomere wurden nach der Vorschrift von *Bradt et al.* ohne Ca^{2+} assembliert (Präparation siehe Seite 29) und für AFM-Untersuchungen mit verschiedenen Methoden mit Calciumphosphat nachmineralisiert um Ort und Morphologie eines Kristallwachstums zu bestimmen [34].

- (1) Das assemblierte Kollagen wurde mit Aq. dest. gespült und bei 37°C auf einem Glassplättchen getrocknet (Abbildungen 3.33(a) bis 3.33(c)).
- (2) Das assemblierte Kollagen wurde auf einen frisch gespaltenen Glimmer gegeben, mit destiliertem Wasser gespült und getrocknet. Dann wurden 30 µl Calciumphosphat Stammlösung darauf gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet (Abbildungen 3.33(d) bis 3.33(f)).
- (3) Auf das auf einem Si-Waver präparierte assemblierte Kollagen wurden 30 µl Calciumphosphat Stammlösung gegeben und diese bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde 10 mal mit einer Pipette ein Tropfen Aq. dest. auf die Probe aufgebracht und wieder abgesogen. Anschließend wurde die Probe bei 37°C im Trockenschrank getrocknet und im AFM untersucht (Abbildungen 3.33(g) bis 3.33(i)).
- (4) Assembliertes Kollagen wurde auf einem Si-Waver für 12 h im Kühlschrank in gesättigte Calciumphosphatlösung eingelegt und ohne vorheriges spülen mit Aq. dest. vorsichtig mit N_2 (g) trockengeblasen und im AFM abgebildet (Abbildungen 3.33(j) bis 3.33(l)).

(5) Assembliertes Kollagen wurde auf einem Si-Waver präpariert, für 12 h in Calciumphosphat Stammlösung eingelegt und bei 37°C getrocknet (Abbildungen 3.33(m) bis 3.33(o)).

(6) Ein 30 µl Tropfen Calciumphosphat Stammlösung wurde auf einem Si-Waver mit assemblierten Kollagen eingetrocknet (Abbildungen 3.33(p) bis 3.33(r)).

Kollagen mit Calciumphosphat und Vesikeln Assemblierte Kollagenfibrillen wurden auf einen gereinigten Si-Waver aufgebracht, mit Aq. dest. gespült und bei 37°C getrocknet. Dann wurde diese Probe mit einer Flüssigzelle in das AFM gesetzt, einmal trocken gescannt und zuletzt 30 µl Vesikellösung mit Calciumphosphat eingespritzt (Präparation der Vesikellösung siehe Tabelle 2.5, Zeile 12).

2.8.5 Vesikel

Tabelle 2.5: Präparation von Vesikeln. Eine detaillierte Beschreibung aller jemals verwendeten Präparationsschritte ist in Abschnitt 2.2.5 gegeben. Die bei einer bestimmten Präparation implementierten Arbeitsschritte sind in dieser Tabelle in Säule „Präparation“ angegeben. Z.=Zeile, Beschreibung: wichtigste Merkmale dieser Präparation, CP Stlsg. = Calciumphosphat Stammlösung.

Z.	Beschreibung	Abbildung	Präparation
1	in Wasser	3.35(a) - 3.35(c) AFM	1, 2ac, 3, 4 (Aq. dest.), 5, 6, 9, 12 (µl Überstand mit 10 ml Aq. dest.), 14a
2	in Wasser, schnell eingefroren	3.35(d) AFM	1, 2ac, 3, 4 (Aq. dest.), 5, 6, 9, 12 (µl Überstand mit 10 ml Aq. dest.), 13a
3	in Wasser, Überstand unverdünnt weiterverarbeitet, schnell eingefroren	3.35(e) AFM	1, 2ac, 3, 4 (Aq. dest.), 5, 6, 9, 13a
4	in Wasser Überstand unverdünnt weiterverarbeitet, luftgetrocknet	3.35(f) REM	1, 2ac, 3, 4 (Aq. dest.), 5, 6, 9, 14a
5	in Wasser, mit Ionophoren, Überstand unverdünnt weiterverarbeitet, schnell eingefroren	3.35(g) REM	1, 2abc, 3, 4 (Aq. dest.), 5, 6, 9, 13a
6	in Wasser mit Ionophoren, Dialyse gegen. Aq. dest.	3.36(a) AFM	1, 2abc, 3, 4 (Aq. dest.), 5, 6, 7, 8, 10 (Aq. dest.), 13a
7	in Phosphatpuffer, Dialyse geg. CaCl ₂ , schnell eingefroren	3.36(d) AFM	1, 2abc, 3, 4 K ₂ HPO ₄ , 5, 6, 7, 8, 10 (800 ml Aq. dest.), 11 (900 ml CaCl ₂), 13a
8	in Calciumphosphatlsg, Dially. geg. Aq. dest. und CaCl ₂	3.36(g) AFM	1, 2abc, 3, 4 (CP Stlsg), 5, 6, 7, 8, 10 (800 ml Aq. dest.), 11 (900 ml CaCl ₂), 13a
9	in Calciumphosphat mit Phosphoserin, Dialyse erst gegen Aq. dest., dann gegen CaCl ₂	3.36(j) AFM	1, 2abc, 3, 4 (CP Stlsg + P-Ser), 5, 6, 7, 8, 10 (800 ml Aq. dest.), 11 (900 ml CaCl ₂), 13a

Fortsetzung nächste Seite ...

Z.	Beschreibung	Abbildung	Präparation
10	in Phosphatpuffer, mit Ionophoren, Dialyse gegen Aq. dest. und CaCl_2 , Einbettung	3.37(a) TEM	1, 2abc, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 15, 16
11	Phosphatpuffer, ohne Ionophoren, Dially. geg. Aq. dest. und Calciumlösung, Einbettung in Epoxidharz	3.37(b) TEM	1, 2ac, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 15, 16
12	Calciumphosphat Stammlösung, ohne Ionophoren	3.37(c) + 3.37(d) TEM	1, 2ac, 3, 4 (CP Stlsg.), 5, 6, 7, 8, 15, 16
13	Phosphatpuffer, Dialyse gegen Aq. dest. und Calciumlösung	3.38(a) REM	1 2abc 3 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a
14	selbe Probe wie Zeile 13, nach den REM-Aunahmen wurde drei mal ein Tropfen Chloroform von ca. 30 μl auf die Probe gegeben und vorsichtig abgeblasen, um die äußere Hülle der Vesikel aufzulösen und das Innere der Vesikel frei zu legen.	3.38(b) REM	1 2abc 3 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a, spülen mit Chloroform
15	9 mg Phosphoserin in 50 ml Calciumphosphat Stammlösung, mit NaOH auf pH 7	3.39(a) REM	1, 2abc, 3, 4 (CP Stlsg + PS), 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14a
16	Phosphatpuffer	3.39(b) REM	1, 2abc, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a
17	Phosphatpuffer, mit Ionophoren, Dialyse gegen Aq. dest. und Calciumlösung	3.40(a) REM	1, 2abc, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a
18	Phosphatpuffer, mit Ionophoren, vernetzt	3.40(b) REM	1, 2abc, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a, 15
19	Phosphatpuffer, mit Ionophoren, Dialyse gegen Aq. dest. und Calciumlösung	3.40(c) REM	1, 2abc, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a
20	Phosphatpuffer, mit Ionophoren, Dialyse gegen Aq. dest. und Calciumlösung, vernetzt	3.40(d) REM	1, 2abc, 3, 4 (K_2HPO_4), 5, 6, 10, 11, 14a, 15

2.9 NMR

Die Wechselwirkung von Calciumphosphat mit Phosphoserin wurde mit NMR-Untersuchungen näher charakterisiert. Die Proben wurden als Feststoff in Berlin an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) an einem DMX 400 Firma Bruker (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) in einem 4 mm Rotor von Herrn Prof. Jäger und Herrn Dr. Malz gemessen. Die Resonanzfrequenz des gemessenen Kerns sowie die Rotationsfrequenz der Probe sind jeweils in den Spektren (Seite 71) vermerkt. Im Folgenden ist die Präparation für die im NMR untersuchten Proben gegeben.

Tabelle 2.6: Präparation der Calciumphosphat-Phosphoserin Proben. Phosphatpuffer nach Sørensen aus K_2HPO_4 und KH_2PO_4 , pH 7,4. Die Probe wurde nicht extra mit Aq. dest. gespült.

Präparationsschritt	Probe e	Probe f
1 Einwaage	81,0 mg P-Ser (^{13}C - ^{15}N)	80,7 mg P-Ser (^{13}C - ^{15}N)
2 Zugabe (zu jeder Probe)	4,0 ml Aq. dest.	
3	vortexen und Ultraschall bis Probe gelöst	
4 pH-Messung	pH 1,74	pH 1,72
5 Zugabe (zu jeder Probe)	500 μ l NaOH 1 N	
6 pH-Messung	pH 5,29.	pH 5,23
7 Zugabe $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	105 mg	104 mg
8 pH-Messung	pH 4,7	pH 4,65
9 Zugabe (zu jeder Probe)	614 μ l Phosphatpuffer 0,5 M	
10 pH Messung	pH 5,20	pH 5,11
11 P-Ser Konz. (Berechnet)	15,8 mg/ml	
12 Zentrifugieren	1 h bei 1000 g	
13 P-Ser Konz.(Messung s. S. 28)	5 mg/ml \rightarrow ca. 25,5 mg P-Ser in 5,5 ml Überstand	
14	Überstand verworfen,	
15 Einfrieren, Gefriertrocknen	Rückstand wurde im NMR gemessen und für FT-IR (s. S. 28) und REM (s. S. 33) weiter verarbeitet	
16 Ausbeute	66,9 mg	70,7 mg

2.10 XRD

Die XRD-Messungen erfolgten am Institut für Kristallographie und Festkörperphysik der TU Dresden mit einem Röntgenpulverdiffraktometer (D 5000 Siemens) mit Cobalt- $K\alpha$ -Strahlung von Herrn Dr. Meyer gemessen. Als Schrittweite für die Messungen wurden 0,05 Grad gewählt, die Aufnahmezeit betrug 15 s pro Schritt. Ein Winkelbereich von 10° bis 100° wurde abgedeckt, die Messung fand bei Raumtemperatur (25°C) statt. Zur Auswertung der Diffraktogramme wurden die Daten mit den Datensätzen des internationalen Zentrums für Diffraktionsdaten, ICDD verglichen (Diffraktogramme siehe Abbildung 3.18).

3 Ergebnisse und Interpretation

3.1	Calciumphosphat	44
3.1.1	Computermodellierung	44
3.1.2	Calciumphosphat aus wässriger Lösung	52
3.1.3	Zusammenfassung und Interpretation	54
3.2	Phosphoserin	58
3.2.1	Computermodellierung von Phosphoserin	58
3.2.2	Serin und Phosphoserin im Massenspektrometer	59
3.2.3	AFM und REM	65
3.2.4	Calciumphosphat mit Phosphoserin in NMR	69
3.2.5	Infrarotspektroskopie von Calciumphosphat mit Phosphoserin . . .	72
	Simulierte IR-Spektren	72
	Gemessene FT-IR-Spektren	75
3.2.6	Elementaranalyse, XRD und REM	82
3.2.7	Zusammenfassung und Interpretation	85
3.3	Fetuin	88
3.3.1	Fetuin mit Calciumphosphat	88
3.3.2	Fetuin mit Kollagen	94
3.3.3	Zusammenfassung und Interpretation	97
3.4	Osteocalcin	101
3.4.1	Osteocalcin im MALDI-MS	101
3.4.2	Osteocalcin im ESI-MS	101
3.4.3	Zusammenfassung und Interpretation	105
3.5	Kollagen	107
3.5.1	Kollagen mit Calciumphosphat	107
3.5.2	Kollagen mit Phospholipiden	109
3.5.3	Zusammenfassung und Interpretation	110
3.6	Künstliche Vesikel	112
3.6.1	Zusammenfassung und Interpretation	116

3.1 Calciumphosphat

3.1.1 Computermodellierung

Die ersten Schritte der homogenen und heterogenen **Nukleation** sind experimentell schwer zugänglich, deshalb wurden Computersimulationen durchgeführt, um einen Einblick in deren Ablauf zu bekommen. Als ersten Schritt der Nukleation überwinden ein Ca^{2+} und ein HPO_4^{2-} bzw. H_2PO_4^- ihre Hydrathüllen und bilden ein Dimer [275, 239]. Es wurden die Gesamtenergien geometrisch optimierter Ionenkomplexe berechnet, um daraus die wichtigsten Bindungsenergien zwischen den Ionen, und zwischen den Ionen und den Wassermolekülen abzuleiten. Alle Energien stammten aus *ab initio* Berechnungen mit dem STO-3G Basisset und wurden, soweit möglich, mit dem 6-31G** Basisset überprüft. Eine Zusammenfassung der Parameter der Berechnungen ist ab Seite 20 zu finden. Die berechneten Bindungsenergien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Ausführliche Tabellen mit Ionenabständen und Bindungsenergien sowie deren Vergleich zu Literaturdaten befinden sich im Anhang, Abschnitt 4, Seite 129.

Ca^{2+} in Wasser Bevor es zur $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{HPO}_4^{2-}$ -Dimerbildung kommen kann, muss die Hydrathülle der Ionen verdrängt werden. Die Stabilität der Hydrathüllen wurde berechnet, indem jeweils ein Wassermolekül zu einem $[\text{Ca}^{2+} + n \times \text{H}_2\text{O}]$ Komplex hinzugefügt und geometrisch optimiert wurde. Danach wurde die Bindungsenergie ermittelt. Der Abstand $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{O}(\text{H}_2)$ lag mit einem Wasser bei 2,1 Å, stieg jedoch auf einen minimalen $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{O}(\text{H}_2)$ Abstand von 2,37 Å bei einer Hydrathülle aus 14 H_2O . Dies liegt nahe dem von *Schwenk et al.* errechneten 2,46-2,57 Å [220]. Die Mulliken-Ladungen des Ca^{2+} sank mit der Zunahme der Wassermoleküle in der Hydrathülle und näherte sich asymptotisch einem Wert von etwa 0,8 eV an, die überschüssige Ladung verteilte sich auf die umgebenden Wassermoleküle (siehe Abbildung 3.1(c)). Dies bedeutet, dass die positive Ladung des Calciumkations räumlich nicht auf das Calcium beschränkt blieben, sondern sich wolkenartig auf die umliegenden H_2O ausbreiteten. Die Bindungsenergie eines H_2O wurde über die Differenz der einzelnen Gesamtenergien für $n=1-14$ berechnet:

$$E_B = E_{ges}[\text{Ion(en)} + (\text{H}_2\text{O})_n] - E_{ges}[\text{Ion(en)} + (\text{H}_2\text{O})_{n-1}] - E_{ges}[\text{H}_2\text{O}] \quad (3.1)$$

$$\Delta E_{\text{OB}} = \frac{E_{ges}[\text{Ion(en)} + (\text{H}_2\text{O})_n] - E_{ges}[\text{Ion(en)}] - (E_{ges}[\text{H}_2\text{O}] \times n)}{\text{Anzahl der Bindungen}} \quad (3.2)$$

Hierbei ist $E_{ges}[\text{Komplex}]$ die Gesamtenergie des in Klammern gegebenen Komplexes oder Moleküls, E_{OB} die durchschnittliche Bindungsenergie von gegebenen Objekten im Komplex (meist der H_2O), über eine sinnvolle Anzahl von Bindungen. Die Anzahl der Bindungen wurde aus dem Molekülmodell bestimmt (siehe „Präparation“, Abschnitt 2.1 und Tabelle 4.7, Spalten $B.[n]$ für die verwendeten Werte).

Der Ca^{2+} -Graph in Abbildung 3.1(a) zeigt die gleichen Charakteristika wie bereits von *Bakó et al.* publiziert [9], auch die Anordnung der H_2O um das Ca^{2+} ist, soweit in dessen Publikation dargestellt, identisch. Das erste H_2O -Molekül war in den hier vorliegenden Berechnungen fast sechsmal stärker an das Ca^{2+} gebunden als zwei Wasser miteinander wechselwirken. Die deutliche Abnahme der Bindungsenergie beim Hinzufügen des siebten H_2O war auf den Symmetriebruch und die sich nun stark gegenseitig beeinflussenden H_2O zurückzuführen. Die Anordnung von acht Wassermolekülen war wieder symmetrisch, daher war nur ein kleiner Energiesprung zu verzeichnen. Das neunte Wassermolekül brach ein weiteres Mal die Symmetrie, der Abfall der Bindungsenergie war dementsprechend überdurchschnittlich groß. Mit dem zehnten H_2O wurde zum ersten Mal die zweite Schale der Hydrathülle besetzt (9+1) und es kam zu einer leichten Zunahme der Bindungsenergie im Vergleich zum vorherigen H_2O . Die Zunahme der der Bindungsenergie des 11. (10+1), 12. (10+2) und 13. (9+4) H_2O entstand wahrscheinlich auf Grund der Wechselwirkung der δ^- -geladenen O der 2. Schale der Hydrathülle mit den δ^+ -geladenen H der inneren Schale, da die gegenseitige Abstoßung der Protonen der H_2O -Moleküle der inneren Schale verringert wurde. Die 14 H_2O zeigen eine 10+4 Anordnung. Mit Besetzung der zweiten Schale der Hydrathülle variierte die Gesamtenergie bei gleicher Anzahl von H_2O deutlich, je nach dem ob die Wassermoleküle der zweiten Schale miteinander interagierten (geringere Gesamtenergie = größere Bindungsenergie) oder nicht (höhere Gesamtenergie = kleinere Bindungsenergie).

Das neunte Wassermolekül war nicht mehr stärker an das Calciumion gebunden, als zwei Wassermoleküle miteinander Wechselwirken. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Computersimulationen und experimentellen Ergebnissen aus der Literatur [9, 121]. Der durchschnittliche $\text{Ca}^{2+}\text{-O}(\text{H}_2)$ Abstand lag bei diesen Berechnungen mit 2.39 Å knapp unter dem meist publizierten Wert von 2.46 Å [72, 9].

Alle für diese Arbeit errechneten Bindungsenergien von H_2O an ein Ion, von Ionen untereinander und Wassermolekülen innerhalb eines Wasserklasters liegen um einen Faktor von etwa 1,6 über den in der Literatur gegebenen modellierten oder experimentell bestimmten Werten. Ein Vergleich der Energiewerte mit den Daten aus der Literatur ist in Tabelle 4.6 gegeben. Diese Diskrepanz lässt sich vor allem durch die unterschiedlichen Rechenmethoden erklären.

$[\text{H}_x\text{PO}_4]^{x-3}$ in Wasser Auch für die Berechnung der Bindungsenergien zwischen Wasser und dem Phosphat bei unterschiedlichen Protonierungsstufen wurde dem Komplex jeweils ein H_2O hinzugefügt, dieser geometrisch optimiert und die Gesamtenergie desselben berechnet.

Die errechnete Wechselwirkung zwischen H_3PO_4 , bzw. H_2PO_4^- und Wasser war kaum stärker als die der Wassermoleküle untereinander, nur die ersten beiden H_2O waren stärker an das Phosphat gebunden als an ein weiteres H_2O . Hierbei lag die Adsorption des ersten H_2O bei H_2PO_4^- etwa zweimal über der zweier Wasser, die des H_3PO_4 zeigte eine kaum erhöhte Bindungsenergie.

Eine deutlich stärkere Affinität zum Wasser zeigte das HPO_4^{2-} -Anion. Hier wurde das erste H_2O viermal stärker an das Anion gebunden als zwei Wasser miteinander wechselwirken.

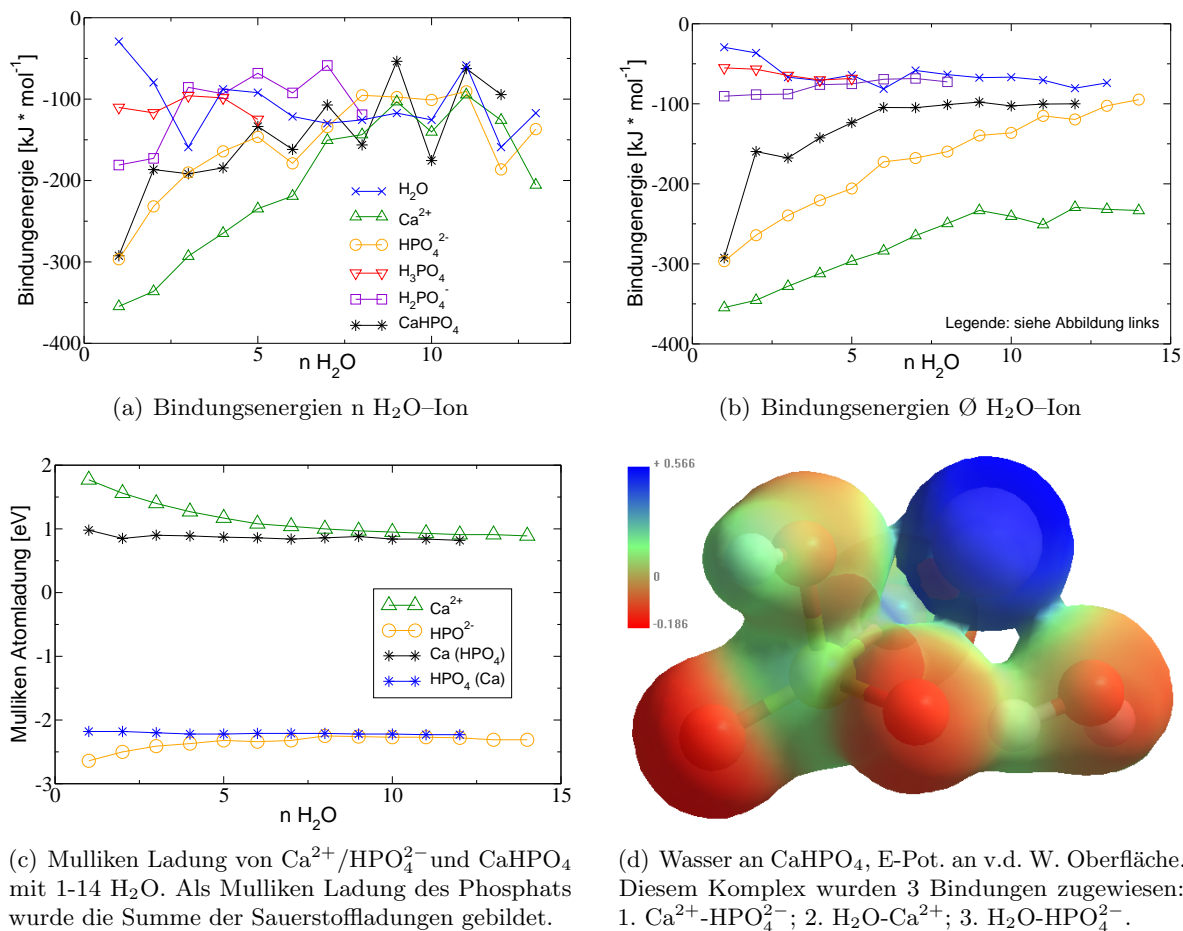


Abbildung 3.1: Hydrathülle für ausgesuchte Ionen. Daten siehe Tabelle 4.7.

Erst das siebte Wassermolekül zeigte gegenüber dem Wasser keine erhöhte Bindungsenergie mehr. Die dennoch im Vergleich zum Ca^{2+} schwächere Wechselwirkung lässt sich über die niedrigere Ladungsdichte erklären. So betrug die van der Waals Oberfläche des Ca^{2+} nur etwa 13 \AA^2 , während die des HPO_4^{2-} bei gleicher Ladung ca. 83 \AA^2 betrug. Um die Ladung des Phosphats abzuschätzen, wurde die Summe der Mulliken-Ladungen der vier Sauerstoffatome des Phosphats gebildet. Diese wurde gegen die Anzahl der adsorbierten H_2O aufgetragen (siehe Abbildung 3.1(c)). Im Gegensatz zum Ca^{2+} zeigte das HPO_4^{2-} eine leichtere Verteilung der Ladung auf das umgebende Wasser. Das zentrale, positiv geladene Phosphoratom verhindert vermutlich den Abzug der Ladung in die Hydrathülle. Die in der Literatur angegebene Anzahl von 16 H_2O um ein PO_4^{3-} als innere Hydrathülle stimmt gut mit den hier errechneten Modellen überein, dabei ist das vermittelnde Wasserstoffatom in die Mitte verschoben [67].

$\text{Ca}^{2+} \cdots \text{HPO}_4^{2-}$ – **Dimer** – **Quadrumer** Die Adsorptionsstärke von Wasser an das CaHPO_4 -Dimer war vergleichbar mit der von Wasser an HPO_4^{2-} . Die Mulliken-Ladungen hingegen waren durch die Dimerbildung reduziert und ändern sich mit zunehmender Hydrathülle praktisch nicht mehr (siehe Abbildung 3.1(c)). Die relativ zur Mulliken-Ladung starke Wasseradsorption der ersten drei H_2O war auf die zweifache Bindung eines H_2O an

ein $\text{O}(\text{HPO}_3^{2-})$ und das Ca^{2+} zurückzuführen (siehe Abbildung 3.1(d)). Des Weiteren zeigte dieses Dimer einen starken Dipol bei geringer räumlicher Ausdehnung (v. d. Waals Oberfläche $[\text{CaHPO}_4]$: 92.09 \AA^2). Die durchschnittliche Bindungsenergie der H_2O -Moleküle an das Dimer liegt deutlich unter der von Ca^{2+} oder HPO_4^{2-} .

Als Beispiel für ein hydriertes Dimer wurden 20 H_2O als eine erste Hydrathülle um ein $[\text{Ca} \cdots \text{PO}_4]^-$ -Dimer angelagert und das System geometrisch optimiert. Danach wurden die Wassermoleküle wieder entfernt und für dieses Dimer, ohne weitere geometrische Optimierung, die Bindungsenergie ausgerechnet ($E_{\text{Bind.}} = E_{\text{ges.}} - E_{\text{Ca}} - E_{\text{PO}_4^{3-}}$). Auch wenn diese Berechnung, auf Grund des kleinen Basissatzes, noch keinen genauen Wert über die Bindungsstärke des Dimers in Wasser ergab, so wird dennoch ersichtlich, dass die Bindung zwischen den Ionen deutlich geschwächt wurde (siehe Abb. 3.6, Wert: CaPO_4^- dehydriert, oben links).

Da ein Trimer aus zwei Calcium und einem Phosphat stabiler war, als zwei Phosphate mit einem Calcium (siehe Tabelle 3.1), ist der $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{HPO}_4^{2-} \cdots \text{Ca}^{2+}$ -Komplex, als nächst grösserer Komplex bei der Nukleation wahrscheinlich. Dieses Trimer ist positiv geladen, so folgt nun die Anlagerung eines weiteren Phosphats und es entsteht ein Quadrumer, dessen Protonierung vom pH-Wert abhängt.

Die Geometrien der Ionenkomplexe mit mehr als zwei Ca^{2+} wurden der Literatur entnommen und mit den hier verwendeten Parametersatz noch einmal optimiert, um die Energiewerte mit den hier gerechneten, kleineren Komplexen vergleichen zu können [126, 251]. Diese sind in Tabelle 3.1 unten mit * gekennzeichnet. Des Weiteren wurde der Quotient aus der gesamten Bindungsenergie des Komplexes ($E_{B.\text{ges.}}$) und seiner Oberfläche gebildet. Dieser ist ein Hinweis auf dessen Stabilität des Komplexes im Wasser, da die lösenden Kräfte zum Grossteil über die Oberfläche vermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Stabilität sowohl mit steigender Grösse, als auch mit der Deprotonierung zu nimmt.

Simulierte IR-Spektren Aus den simulierten Ionenkomplexen lassen IR-Spektren berechnen. Ein Vergleich von gemessenen Spektren mit Simulierten gibt einerseits Auskunft über die Qualität der Simulation und kann andererseits die das Spektrum bestimmenden Wechselwirkungen aufdecken.

Die in der Literatur gefundenen, simulierten IR-Spektren zeigen im Vergleich mit experimentellen Messungen einen sehr unterschiedlichen Grad an Übereinstimmung. So erreichten *Lambie et al.* eine sehr gute Übereinstimmung der berechneten und gemessenen IR-Spektren von Serin, was auf das Nachskalieren der verwendeten Kraftfelder in der Berechnung und die exakte experimentelle Messung (in Argonatmosphäre bei 15 K) zurückzuführen ist [138]. Im Gegensatz hierzu ist die Differenz zwischen gemessenem und berechnetem Spektrum bei Calciumphosphat-Komplexen deutlich größer, da schon wenige Ionen eine große Anzahl an Kombinationen ermöglichen und sich nicht alle natürlich auftretenden Einflüsse (z. B. Fremdionen oder Oberflächeneffekte) genau simulieren lassen [25].

(H) PO_4 (simulierte FT-IR Spektren) Die simulierten IR-Spektren des Phosphats zeigten bei steigender Protonierung erst nach Einteilung in die verschiedenen Schwingungsmodi

3.1. Calciumphosphat

Tabelle 3.1: Ausgewählte Bindungsenergien sortiert nach Oberfläche. $E_{B.ges.} = (E_{ges}[\text{Komplex}] - \sum E_{ges}[\text{beteiligter Ionen}]) / B.[n]$. $B.[n]$ = Anzahl der Bindungen, Ob. = vom Lösungsmittel zugängliche Oberfläche. * Die Geometrie dieser Komplexe wurde der Literatur entnommen und mit gelockerten Abbruchkriterien nachgerechnet (s. S. 22).

Komplex (in Vakuum)	Ob. \AA^2	$E_{B.ges.}/\text{Ob.}$ $[\frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{\AA}^2}]$	$E_{B.ges.}/B.[n]$ $[\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}]$	Kommentar & B.[n]
$\text{H}_2\text{O} - \text{Ca}^{2+}$	141	-2,5	-355	Einzelwert, erstes H_2O
$\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$	171	-0,2	-29	2 H_2O , 1 H-Brücke
$\text{PO}_4^{3-} - \text{Ca}^{2+}$	207	-15,1	-3120	Einzelwert
$\text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+}$	210	-15,3	-3215	Einzelwert, Ca^{2+} gegenüb. $\text{H}(\text{PO}_4)$
$\text{PO}_4^{3-} - \text{Ca}^{2+}$	211	0,25	53	Einzelwert, dehydriert
$\text{Ca}^{2+} - \text{PO}_4^{3-} - \text{Ca}^{2+}$	220	-29,2	-3216	Ø über 2 Bindungen
$\text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{Ca}^{2+}$	221	-8,5	-1869	Einzelwert
$\text{H}_3\text{PO}_4 - \text{Ca}^{2+}$	228	-0,5	-119	Einzelwert
$\text{Ca}^{2+} - \text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+}$	229	-18,6	-2125	Ø über 2 Bindungen
$\text{HPO}_4^{2-} - \text{H}_2\text{O}$	242	-1,2	-297	Einzelwert, 1. H_2O
$(\text{PO}_4^{3-} - \text{Ca}^{2+}) \times 2$	312	-34,2	-2664	Ø über 4 Bindungen
$\text{HPO}_4^{2-} - 2 \text{Ca}^{2+} - \text{PO}_4^{3-}$	316	-29,3	-2312	Ø über 4 Bindungen
$(\text{Ca}^{2+} - \text{HPO}_4^{2-}) \times 2$	324	-23,1	-1871	Ø über 4 Bindungen
$\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$	327	-2,1	-61	Ø über 9 H_2O , 11 H-Brücken
$\text{Ca}^{2+} - 2 \text{HPO}_4^{2-}$	352	-4,8	-841	Ø über 2 Bindungen
$\text{H}_2\text{O} - \text{Ca}^{2+}$	404		-90	Einzelwert, 11. H_2O (1. H_2O der zweiten Schale)
$\text{HPO}_4^{2-} - \text{H}_2\text{O}$	427		-94	Einzelwert, 11. H_2O
$\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$ *	315	-42		$E_{B.ges.} = -13227 \text{ kJ/Mol}$
$\text{Ca}_6[\text{PO}_4]_4$ *	460	-55		$E_{B.ges.} = -25111 \text{ kJ/Mol}$
$\text{Ca}_9[\text{PO}_4]_6$ *, Posner Cluster	593	-56		$E_{B.ges.} = -32971 \text{ kJ/Mol}$

(= Gruppen=Gp) systematische Verschiebungen der Wellenzahl. Hierbei wanderten die Schwingungen mit Wellenzahlen kleiner 600 cm^{-1} (ρ P-O-H und δ P-O 1-3 Schwingungen) mit steigender Protonierung zu noch kleineren Wellenzahlen und Schwingungen mit Wellenzahlen größer 600 cm^{-1} (ν_s P-O 0-4, ν_{as} P-O 1-3, δ O-H und ν O-H) zu größeren Wellenzahlen (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Simulierte IR-Signale von Phosphat und deren Veränderung mit zunehmender Protonierung (Wellenzahl [cm^{-1}]). Eine Zuordnung zu der in Abschnitt 3.1.1 getroffenen Gruppeneinteilung (Gp a-f) ist in der ersten Zeile gegeben.

	Gp a ρ P-O-H	Gp bc δ P-O 2-2	Gp bc δ P-O 1-3	Gp de ν_s P-O 0-4	Gp de ν_{as} P-O 1-3	Gp f δ (P-)O-H	ν (P-)O-H
PO_4^{3-}		339	451	617	884		
HPO_4^{2-}	335	406	443-422	698	747-969	1280	4017
H_2PO_4^-	230-341 + ρ/ν OH		375-437	742	890-985	1354-1421	4176-4178
H_3PO_4	100-166	161	251-389	748	970-1011	1377-1469	4240-4270
Tendenz	\searrow	-	\searrow	\nearrow	\nearrow	\nearrow	\nearrow

Ca HPO_4 (simulierte FT-IR Spektren) Um die Auswirkung des Ca^{2+} auf das IR-Spektrum des Phosphat-Ions zu bestimmen, wurden die Spektren von HPO_4^{2-} , CaHPO_4 und $[\text{CaHPO}_4]_2$ berechnet und nach systematischen Veränderungen untersucht. Für den $\text{HPO}_4^{2-} \cdots \text{Ca}^{2+}$ -Komplex wurde jeweils ein Spektrum, für den Fall, dass das Calcium direkt mit dem protonierten Sauerstoff wechselwirkt (kurz: CaHP, in Abbildung 3.2 rot), aufgenommen und eines, in dem das Proton gegenüber des Calciums an das Phosphat gebunden ist (kurz: CaPH, in

Abbildung 3.2 blau). Das berechnete Spektrum des $[\text{CaHPO}_4]_2$ wurde mit einem gemessenen Calciumphosphat-Spektrum verglichen (siehe Abbildung 3.16 und 3.17). Signale mit einer Intensität unter 1% der Maximalintensität wurden verworfen. Auch in diesen Spektren half die Unterscheidung der Schwingungsmodi, um systematische Veränderungen zu erkennen (siehe Tabelle 3.3, graphisch Darstellung siehe Abbildung 3.2). Mit zunehmendem Wachstum des Komplexes liessen sich folgende Tendenzen innerhalb der Schwingungsgruppen ableiten (Erläuterung der IR-Terminologie in Abschnitt 4):

- **Gruppe a** [ρ P-O-H]: deutliche Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen und Einfluss auf Intensität
- **Gruppe b** [ν P-O]: Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen, aber geringer Einfluss auf Intensität
- **Gruppe c** [ν/δ O-P-Ca²⁺]: Sammelgruppe für uneindeutige O-P-Ca Schwingungen. Ableitung einer Tendenz nicht möglich.
- **Gruppe d** [γ O₃-PO]: Absinken der Wellenzahlen bei mittlerer bis starker Signalstärke
- **Gruppe e** [$\nu_s + \nu_{as}$ P-O]: Leichte Verschiebung zu höheren Wellenzahlen, gleichbleibend starke Signale
- **Gruppe f** [δ P-O-H]: Verschiebung zu höheren Wellenzahlen, Intensität ist mittelstark und variiert schwach.

3.1. Calciumphosphat

Tabelle 3.3: Simulierte IR-Signale von HPO_4^{2-} , $\text{Ca}^{2+}\text{-HPO}_4^{2-}$ und $[\text{CaHPO}_4]\times 2$ (kurz: 2 CaP). Für das CaHPO_4 -Dimer wurden zwei Fälle berücksichtigt: (1) Ca^{2+} hat direkten Kontakt zum protoniertem Sauerstoff (kurz: CaHP, in Abb. 3.2 rot); (2) protonierter Sauerstoff liegt auf der gegenüberliegenden Seite des Phosphats (kurz: CaPH, in Abb. 3.2 blau). I [%] = relative Intensität, größter Peak 100%; Schwingungen gleichen Charakters werden in Gruppen (Gp a-f) zusammengefasst, Spektren siehe Abbildung 3.2, Seite 51.

2 CaP	CaPH	CaHP	PO_4H	I	I [%]	Gp	Schwingungsmodi
	109			v st	92	a	ρ (P-)O-H
113				w	7	a	ρ $\text{O}_3(\text{PO})\text{-Ca}^{2+}$
130				v w	5	a	ρ O-H + ρ $\text{O}_3(\text{PO})\text{-Ca}^{2+}$
		203		w	5	b	δ O-P- Ca^{2+}
	212			v w	4	b	δ (O-P- Ca^{2+})
272				m	28	b	δ (P-O) $\times 2$
292				m	42	b (a)	$(\delta$ (P-O) + τ (OH)) $\times 2$
306				m	23	b	$(\delta$ (O-P- Ca^{2+}) + ρ (OH)) $\times 2$
		332		v st	100	a	ρ (OH) + γ $\text{O}_3(\text{PO})$
			334	v w	2	a	ρ (OH)
		396		v w	4	b	δ (O-P-Ca) + δ O-P-O
406				m	32		$(\rho$ (O-P- Ca^{2+}) + δ (OPO)) $\times 2$
			406	w	9	b	δ_1 $\text{O}_2\text{-P-O}_2$
			422	w	11	b	δ_2 $\text{O}_2\text{-P-O}_2$
		435		w	6	c	ν (P- Ca^{2+})
			443	m	22	b	δ_3 $\text{O}_2\text{-P-O}_2$
	450			st	81	c	ω $\text{Ca}^{2+}\text{-PO}_3\text{-OH}$
	460			v st	99	c	ω $\text{Ca}^{2+}\text{-PO}_3\text{-OH}$, Kipprichtung 90° verdreht im vgl. zu 450 cm^{-1}
		466		m	31	c	ρ O-P-O + ω O-P-O
471				w	9	c	ν (P- Ca^{2+}) + δ PO_2
	475			w	15	c	ν $\text{Ca}^{2+}\text{-P}$ (O fest, Ca^{2+} mobil)
		494		w	6	c	ω O-O
542				st	67	c	ω (O-P-O) $\times 2$
554				st	73	d	γ O_3 zu P und Ca^{2+}
	598			st	65	d	γ 3 O(zw. P-Ca) auf Ca-P Achse
		607		w	8	d	γ 3 O(zw. P-Ca) auf Ca-P Achse
633				st	65	c	δ OPO bei Ca^{2+}
		698		w	7	e	ν_s O_3
		747		v st	100	d	γ $\text{O}_3\text{-P}$
		770		w	9	e	ν P-O
	784			v w	1	e	ν_s (P- O_4)
		795		m	36	e	ν P-O(H)
802				w	6	e	ν_s (P- O_4)
		964		m	37	e	ν_{as} O-P-O
		968		m	34	e	ν_{as} O-P-O
		969		m	28	e	ν_{as} O-P-O
	971			st	85	e	ν_{as} O-P-O
	975			v st	100	e	ν_{as} O-P-O
		995		v w	3	e	ν_{as} O-P- O_2
1024				m	42	e(f)	ν_s O-P- O_3 (ν P-O(H))
1027				st	58	e(f)	ν_s O-P- O_3 (ν P-O(H))
1068	1068			v st	65	e(f)	ν_s O-P- O_3 (ν P-O(H))
		1259		w	13	f	δ P-O-H
			1280	w	8	f	δ P-O-H
1425				m	36	f	δ P-O-H
	1433			m	34	f	δ P-O-H
			4017	st	80		ν O-H

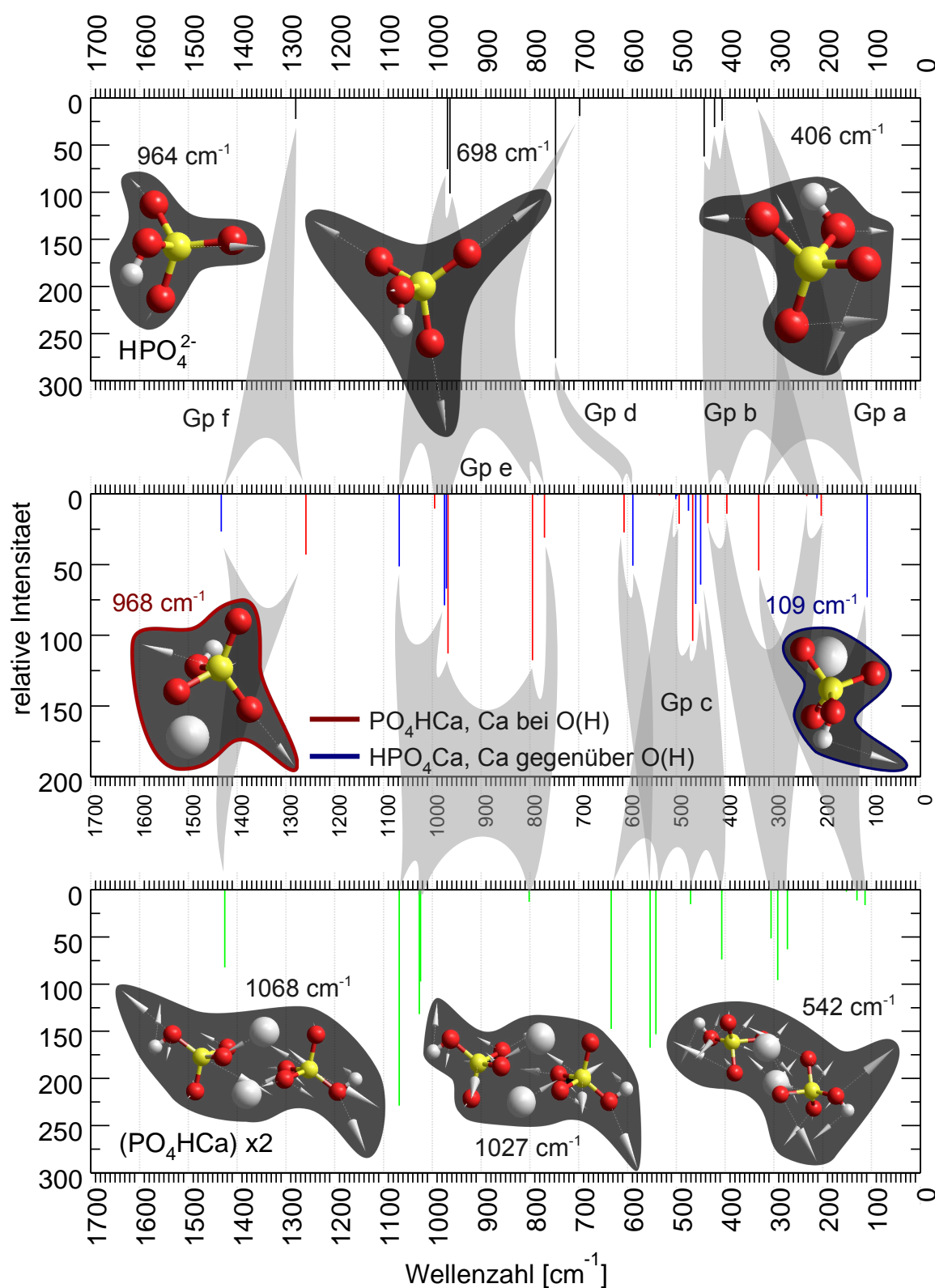
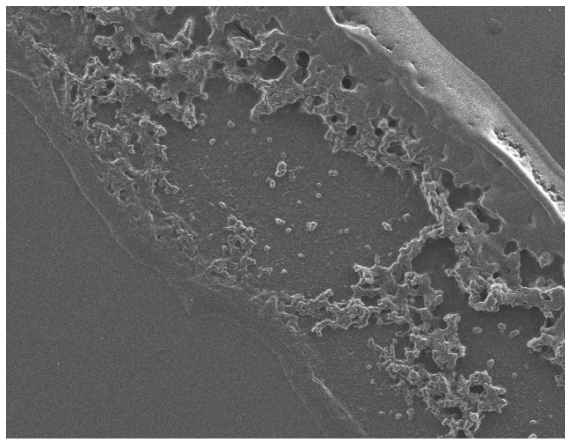


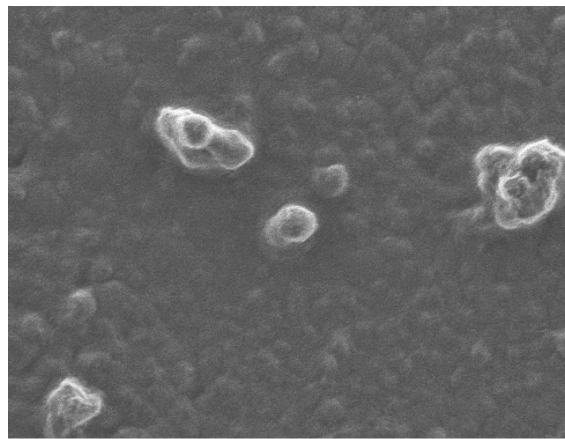
Abbildung 3.2: Darstellung der simulierten IR Spektren mit HPO_4^{2-} . Schwingungen gleichen Charakters wurden in Gruppen (Gp a-f) zusammengefasst. Daten siehe Tabelle 3.3.

3.1.2 Calciumphosphat aus wässriger Lösung

ACP aus wässriger Lösung im AFM und REM Durch Eintrocknen einer reinen Calciumphosphat-Lösung wurde entweder eine amorphe homogene Schicht erzeugt, oder Kugeln mit einem Durchmesser von 100 nm bis 300 nm (siehe Präparation von ACP ohne Zusatz: Abschnitt 2.6.1, Seite 32). Dieser Durchmesser wurden selten über- oder unterschritten, so dass eine physikalisch-chemische Barriere als Ursache angenommen wird. Dabei ist sowohl auf den AFM als auch den REM-Abbildungen eine Unterstruktur dieser Kugeln erkennbar (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Diese Unterstruktur zeigt sphärische Formen in der Größenordnung von 5-50 nm und ist somit deutlich größer als ein Posner-Cluster ($[\text{Ca}_9\text{PO}_4]_6$), dessen Durchmesser im Bereich eines Nanometers liegen müsste. Nach dem Eintrocknen eines Tropfens gesättigter Calciumphosphatlösung wurden keine Kristallite beobachtet.



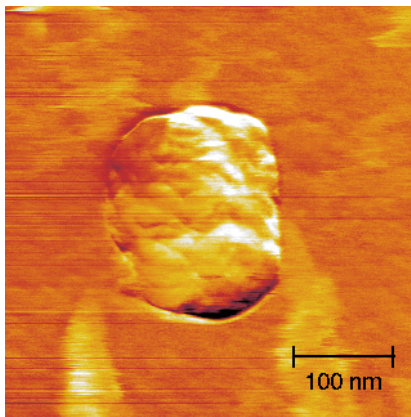
(a) Calciumphosphat, eingetrocknet aus wässriger Lösung auf einen Si-Wafer, Rand eines Tropfens



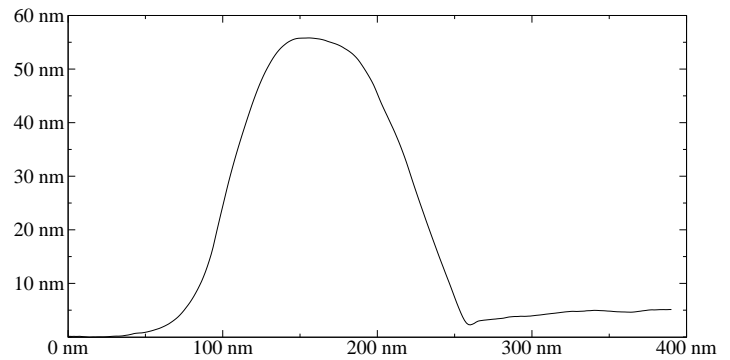
(b) Calciumphosphat aus wässriger Lösung auf Si-Wafer, eine Unterstruktur ist erkennbar

Abbildung 3.3: Calciumphosphat ohne Zusatz. Der eingetrocknete Rand eines Tropfens ist erkennbar (a), Nahaufnahme (b). Präparation siehe Abschnitt 2.6.1.

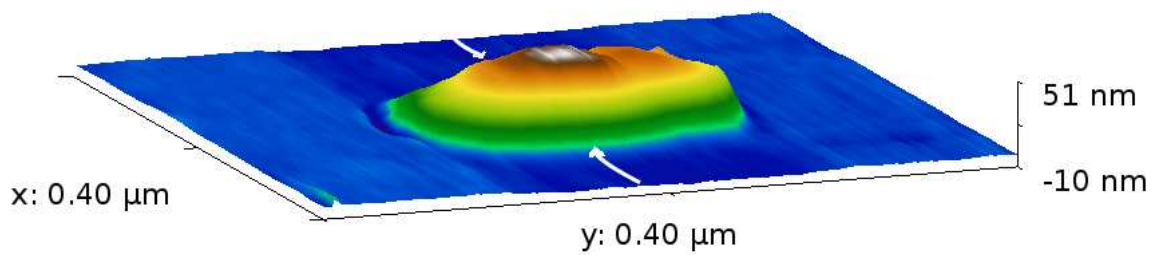
Calciumphosphat-Kristallite aus Lösung Bei schneller, deutlicher Übersättigung einer wässrigen Lösung mit Calcium- und Phosphationen wuchsen im Allgemeinen Kristallite. Geringe Unterschiede im Milieu führten dabei schon zu deutlich unterschiedlichem Habitus und z.T. auch zu anderen Kristallphasen. So bildeten sich aus der Calciumphosphat Stammlösung nach Zugabe von wenigen Tropfen NaOH nadelige Kristallite beim Eintrocknen (siehe Abbildung 3.5(a)). Bei der Mischung von CaCl_2 mit Phosphatpuffer entstanden plattige Kristallite (siehe Abbildung 3.5(b)). Unter welchen Umständen sich direkt aus der Lösung eine Kristallstruktur, oder aber ein amorpher Komplex bildet, ist nicht genau bekannt. Eine Mischung der verschiedenen Niederschlagarten tritt jedoch, soweit erkennbar, nicht auf (Präparation siehe Abschnitt 2.6.1).



(a) ACP aus wässriger Lösung auf Si-Wafer ausgefällt

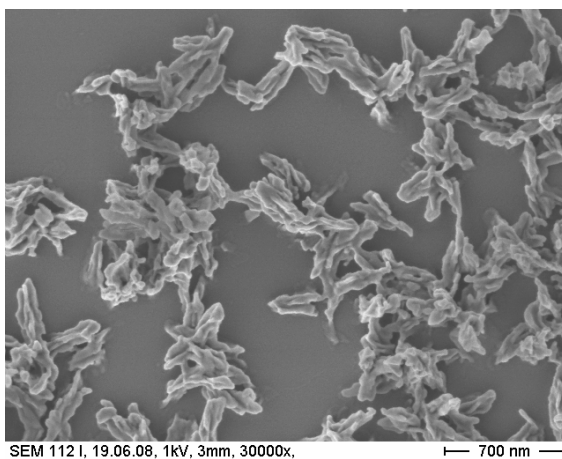


(b) Profil der ACP-Kugel (unterschiedliche Massstäbe der x- und z-Achse)

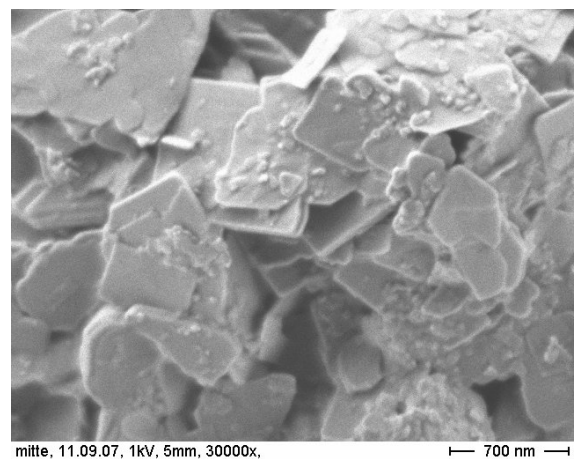


(c) 3d Höhenansicht, Farbgebung nach topographischer Karte, die weißen Linien zeigen die Position des Profils. x und z Achse haben etwa den gleichen Maßstab

Abbildung 3.4: AFM-Abbildungen von Calciumphosphat ohne Zusatz. Die Präparation war identisch mit der auf Abbildung 3.3 gezeigten Proben



(a) Calciumphosphat-Nadeln



(b) Calciumphosphat Plättchen

Abbildung 3.5: REM-Aufnahmen von Calciumphosphat Kristalliten aus wässriger Lösung

3.1.3 Zusammenfassung und Interpretation

Bevor der Einfluss von Biomolekülen auf das Nukleations- und Wachstumsverhalten von Calciumphosphat spezifiziert werden kann, muss dessen Verhalten ohne diese organischen Moleküle bekannt sein. Aus diesem Grund wurden Computersimulationen eines wachsenden Calciumphosphatkomplexes angefertigt und daraus simulierte IR-Spektren errechnet und der erste präzipitierte Keim im AFM abgebildet.

Die aus den Computersimulationen errechneten IR-Spektren des Phosphats waren mit zunehmender Protonierung, abhängig vom Schwingungsmodus, systematischen Verschiebungen unterworfen. Bei Wellenzahlen kleiner 600 cm^{-1} fand für die in diesem Bereich vorhandenen ρ - und δ -Schwingungen eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen statt, bei Wellenzahlen größer 600 cm^{-1} kam es vor allem bei ν -Schwingungen zu einer Verschiebung zu größeren Wellenzahlen.

Ein wachsender Calciumphosphat-Komplex ($\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}\text{-HPO}_4^{2-} \rightarrow [\text{CaHPO}_4]_2$) zeigte in simulierten IR-Spektren ein ähnliches Verhalten. Hier wurden Signale kleiner 800 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen verschoben und Signale, die über 800 cm^{-1} auftraten zu größeren Wellenzahlen (Vergleich mit experimentellen Messungen in Abschnitt 3.2.5).

Die Auswertung der Bindungsenergien aus den *ab initio* Simulationen von hydrierten Ionen und Calciumphosphat-Komplexen zeigte auf Grund des verwendeten, kleinen Basissets (STO-3G) etwa 1,6 mal höhere Energien als in der Literatur gegeben (siehe Tabelle 4.6). Der $[\text{CaHPO}_4]$ -Komplex war deutlich stabiler als ein Wasserkomplex der gleichen Größe (siehe Tabelle 3.1). Die erste Schicht der Hydrathülle von Ca^{2+} und HPO_4^{2-} ist deutlich an das jeweilige Ion gebunden, während die Wassermoleküle mit H_2PO_4^- , H_3PO_4 und CaHPO_4 kaum stärker wechselwirkten als mit sich selbst. Dieses Dimer stellt höchstwahrscheinlich den ersten Schritt der homogenen Nukleation dar [275]. Mit der weiteren Anlagerung von Calcium- und Phosphationen nahm sowohl die Bindungsenergie, als auch der Quotient aus Bindungsenergie pro Oberfläche des Ionenkomplexes zu. Hierbei trägt die Deprotonierung der Phosphatgruppen in den Komplexen zu deren Stabilisierung bei. Dass die Anlagerung eines zweiten Ca^{2+} an einen CaHPO_4 -Komplex zu der Abspaltung eines Protons von der Phosphatgruppe führen kann, wurde von Zahn *et al.* gezeigt [271]. Bei pH 7 liegt jedoch ein Großteil des als Dimer komplexierten Phosphats protoniert vor [269], somit folgt höchstwahrscheinlich auf den $[\text{Ca}_2\text{HPO}_4]^{2-}$ -Komplex der $[\text{CaHPO}_4]_2$ -Komplex.

Die kleinste, durch bildgebende Verfahren darstellbare Struktur, die beim Ausfallen von Calciumphosphat auftritt, ist die Unterstruktur der ACP-Kugeln [66, 246]. Diese zeigte meist sphärische Formen mit einem Durchmesser von 5-50 nm und war somit deutlich größer als ein Posner-Cluster, welcher einen Durchmesser von ca. 1 nm hat und bisher nur mittels Röntgenstreuung experimentell nachgewiesen wurde [93, 105, 14]. Die häufig beobachteten ACP-Kugeln setzten sich brombeerartig aus diesen kleinen Unterstrukturen zusammen. Der Durchmesser der ACP-Kugeln variierte nicht innerhalb einer Präparation, wohl aber zwischen verschiedenen Ansätzen.

Bereits geringe Unterschiede im Milieu führen bei der Calciumphosphatpräzipitation zu

deutlichen Unterschieden in der Morphologie. So genügte in reiner Calciumphosphatlösung eine kleine Temperaturänderung, um statt der ACP-Kugeln nadelige Kristallite zu erhalten. Das Ausfällen von Apatit durch CaCl_2 und K_2HPO_4 erzeugte einen plättchenartigen Habitus.

Interpretation Das Wachstum einer mineralischen Phase, beginnend mit einzelnen Ionen, über einen Komplex bis hin zu sichtbaren Strukturen, kann sowohl durch das Anlagern einzelner Ionen als auch durch die Assemblierung von größeren Komplexen erfolgen. Die Stabilität eines Ionenkomplexes hängt in erster Linie von der Bindungsstärke der Ionen untereinander ab. Diese wird durch Abgabe von Protonen und adsorbierten Wassermoleküle verbessert. Dem Wachstum entgegen wirken die den Mineralkeim auflösenden Kräfte. Diese werden durch Wassermoleküle über die dem Wasser zugängliche Oberfläche des Keims vermittelt. Die Bindungsenergien ($E_{\text{Bind}} = E_{\text{Komplex}} - \sum E_{\text{Ionen}}$) wurden in Abbildung 3.6 gegen die dem Wasser zugängliche Moleküloberfläche für einen Calciumphosphatkeim und einem H_2O -Komplex aufgetragen. Die hier dargestellten Werte stammen aus *ab initio*-Berechnungen im Vakuum. Die Geometrien der $\text{Ca}_6[\text{PO}_4]_3^-$ und $\text{Ca}_9[\text{PO}_4]_6^-$ -Komplexe wurden aus Publikationen von *Kanzaki und Treboux* entnommen [126, 251] und mit den hier verwendeten Parametern noch einmal berechnet, um einen Vergleich mit den kleineren Komplexen zu ermöglichen.

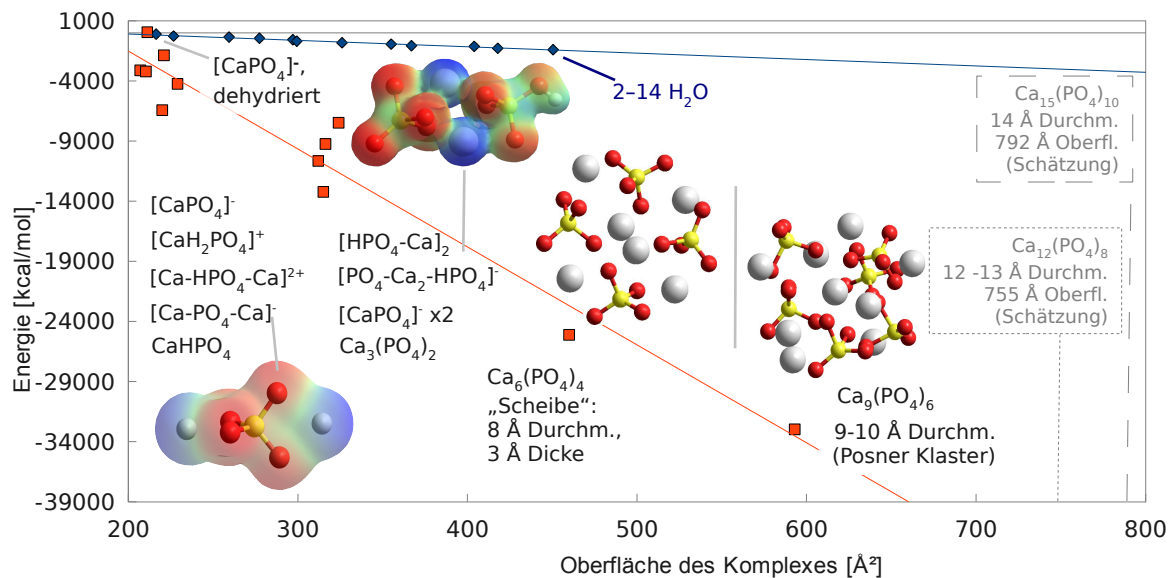


Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Energien von Ionenkomplexen, relativ zu deren Oberfläche. Die Oberflächen der beiden größten Komplexe rechts im Bild wurden molekularmechanisch berechnet und geben vermutlich die Untergrenze der möglichen Größe des Komplexes wieder. Regressionsgerade: $y \approx -80x + 15000$.

Während sich die Stabilität eines Mineralkeims im Vakuum gut errechnen lässt, ist die auflösende Wirkung des Wassers schwieriger zu erfassen, da sie von vielen Parametern wie z. B. pH-Wert, Ionenaktivität oder Temperatur abhängt und deshalb nur jeweils für ein bestimmtes Milieu berechnet werden kann. Um dennoch die Wirkung des Wassers abschätzen zu können, wurde eine geometrische Optimierung eines CaPO_4^- Komplexes mit 20 H_2O durchgeführt und nach Entfernen der Wassermoleküle die Bindungsenergie und Oberfläche des wieder

dehydrierten CaPO_4^- -Komplexes berechnet. Dabei zeigt dieser $[\text{CaPO}_4]^-$ -Komplex bei kaum veränderter Oberfläche eine deutlich geringere Bindungsenergie und erscheint deshalb im oberen linken Eck des Energie/Oberfläche-Diagramms (Abb. 3.6). Das hier berechnete Beispiel gibt eine Verringerung der Bindungsenergie von $3173 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ (758 kcal) wieder, kann allerdings nur als grobe Abschätzung angesehen werden, da die Berechnung der Komplexe (auf Grund der beschränkten Ressourcen), nicht mit dem genauesten **Basissets** vollzogen wurde. Der Ansatz führt jedoch zu einer quantitative Aussage über die Stabilität von Ionenkomplexen in wässriger Lösung.

Die kritische Keimgröße wurde für Calciumphosphat von *Posner et al.* auf einen Durchmesser von 10-15 Å geschätzt [193]. Der Komplex läge somit zwischen einem $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3$ und einem $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_5$ -Komplex (siehe Abbildung 3.6 unten rechts). Der Wert passt gut in das oben errechnete Szenario, da die Calciumphosphatkomplexe bei voller Hydrierung höchstwahrscheinlich noch etwas größer als die hier im Vakuum berechneten Komplexe sind.

In der Praxis bilden sich nicht sofort Ionenkomplexe aus deprotonierten Phosphaten [269]. Dies zeigt der oft langsam abfallende pH-Wert, der in den Minuten und Stunden nach der Niederschlagsbildung einsetzt [162, 161]. Sowohl die Abspaltung eines Protons bei neutralem bis leicht saurem pH [271] als auch die Abnahme der Entropie erfordern Energie. Kann diese Energiebarriere nicht sofort mit der Bildung der ersten Agglomeration überwunden werden, befinden sich Protonen und Wassermoleküle in den Komplexen, die die initiale mineralische Phase verlassen müssen, um zu einer stabileren Calciumphosphatphase zu gelangen. Dabei kommt es vermutlich zu einem erhöhtem H_3O^+ -Anteil in der ersten und zweiten Schicht der Hydrathülle des Komplexes, welche die Annäherung weiterer Ca^{2+} verhindert. Bei HAP geht man von einer Immobilisierung der Wassermoleküle bis zu einem Abstand von 6 Å von der Kristalloberfläche aus [272]; dies würde die Verteilung der Protonen in der Lösung deutlich verzögern. Auch Phosphationen können sich nicht ohne weiteres an einen solchen Komplex anlagern, da diese bei Annäherung protoniert werden, aber nur als negativ geladene Ionen eingebaut werden können (siehe Abbildung 3.7(b)). Auf diese Weise könnte die ACP-Unterstruktur kurzzeitig stabilisiert werden. Die Größe solcher Komplexe müsste somit von pH und Ionenaktivität abhängen.

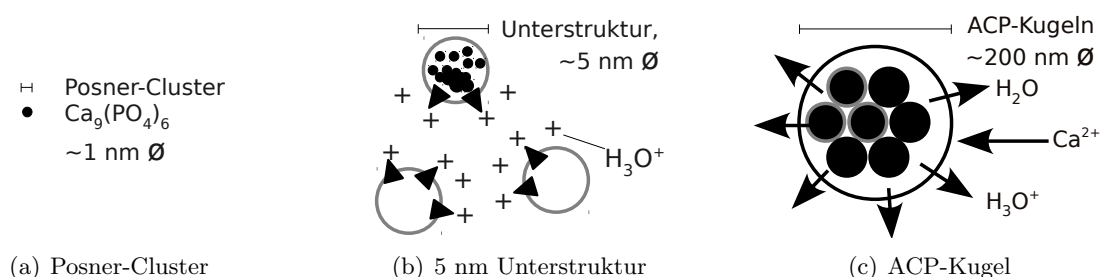


Abbildung 3.7: Wachstumsmodell für ACP-Kugeln

Nachdem sich die H_3O^+ -gleichmäßig in der Lösung verteilt haben, verringert sich die abstoßende Wirkung zwischen den Unterstrukturen und es kommt zur Bildung der ACP-Kugeln Abbildung 3.7(c). Da diese Kugeln eine monomodale Größenverteilung zeigen (siehe

Abbildung 3.20), kann eine physikalische Wachstumsbarriere angenommen werden. Der oben beschriebene Ablauf könnte auch hier eine geladene Schicht aus H_3O^+ -entstehen lassen, die, wenn eine gewisse Stärke erreicht ist, die weitere Anlagerung von Calciumphosphat verhindert und die ACP-Kugeln bis zur nächsten Phasenumwandlung stabilisiert. Eine Abstoßung von Nanopartikeln und Kolloiden untereinander auf Grund der umgebenden, geordneten und geladenen Wasserschichten ist ein bekannter Effekt und wurde ausführlich von *Pollack et al.* und *Ise et al.* mit unterschiedlichen (Nano)Partikeln untersucht und beschrieben [132, 192, 117, 175]¹.

Von *Termine et al.* wurde nachgewiesen, dass ein hohes Ca/P-Verhältnis die Bildung der ACP-Kugeln beschleunigt [248], aber die Umwandlung in eine kristalline Phase verlangsamt [247]. Vermutlich führt die erhöhte Menge Ca^{2+} schon bei der Bildung der Unterstrukturen zu einer vermehrten Abspaltung von Protonen und so zu stabileren ACP-Kugeln als bei kleinerem Ca/P-Verhältnis. Die zur Phasenumwandlung nötige Auflösung wird erschwert.

Die in diesem Modell ersichtliche pH-Abhängigkeit wurde von *Termine et al.* experimentell nachgewiesen [248, 162]. Schon der leichte pH-Anstieg von 7,4 auf 7,7 verzögert den ACP-Niederschlag und die Phasenumwandlung um Stunden. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür sind die in großer Menge auftretenden OH^- -Ionen. Diese bilden zusammen mit dem Ca^{2+} stabile Komplexe, so dass deutlich weniger Kationen zur Komplexbildung mit dem Hydrogenphosphat zur Verfügung stehen und deshalb weniger Protonen von den Phosphatgruppen abgespalten werden.

¹Allgemein wird die DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek Theorie) -Theorie verwendet, um das Verhalten von kleinen Partikeln und Kolloiden in Lösung zu beschreiben [238]

3.2 Phosphoserin

3.2.1 Computermodellierung von Phosphoserin

Die wichtigste Kraft, die die Wechselwirkung zwischen Phosphoserin und den Ionen des Salzes bestimmt, ist das elektrostatische Potential. Bei einem pH-Wert von 5 liegt das Phosphoserin als $\text{HPO}_3^- \text{-O-CH}_2\text{-CH(NH}_3^+)\text{-CO}_2^-$ -Ion vor [242]. Diese Protonierung wurde gewählt, um möglichst nahe an der Protonierung der NMR- und MS-Proben zu liegen.

Als Ergebnis der Computersimulation des Phosphoserins (Parameter siehe Abschnitt 2.1) wurde dieses Potential im Abstand des van der Waals-Radiuses mit und ohne angelagertem Ca^{2+} dargestellt. Das elektrostatische Potential des Phosphoserins zeigte an der Phosphatgruppe und an der Carboxylgruppe die stärkste negative Ladung und somit zwei mögliche Bindungsstellen für ein Ca^{2+} (Abbildung 3.8(a)). Die minimale Gesamtenergie des geometrisch optimierten Komplexes zeigte für die Bindung des Ca^{2+} an die Phosphatgruppe einen um etwa 227 kJ/mol geringeren Wert als für die Bindung an die Carboxylgruppe. Außerdem war eine durch die positive Ladung der Aminogruppe, bzw. Aminogruppe + Ca^{2+} vermittelte V-förmige Faltung des Phosphoserins zu beobachten, so dass die Protonen der Aminogruppe sich den Sauerstoffatomen der Phosphat- und Carboxylgruppe annäherten und nicht mehr eindeutig einer bestimmten funktionellen Gruppe zuzuordnen waren (Abbildung 3.8(b)). Möglicherweise kann ein Proton über das gesamte Phosphoserin transportiert werden. Die Anlagerung eines negativ geladenen Phosphats an die Aminogruppe ist auch wahrscheinlich. Insgesamt zeigte diese Aminosäure ein deutliches Potential über die gesamte Oberfläche, so dass ein Einbau in amorphes Calciumphosphat begünstigt wird.

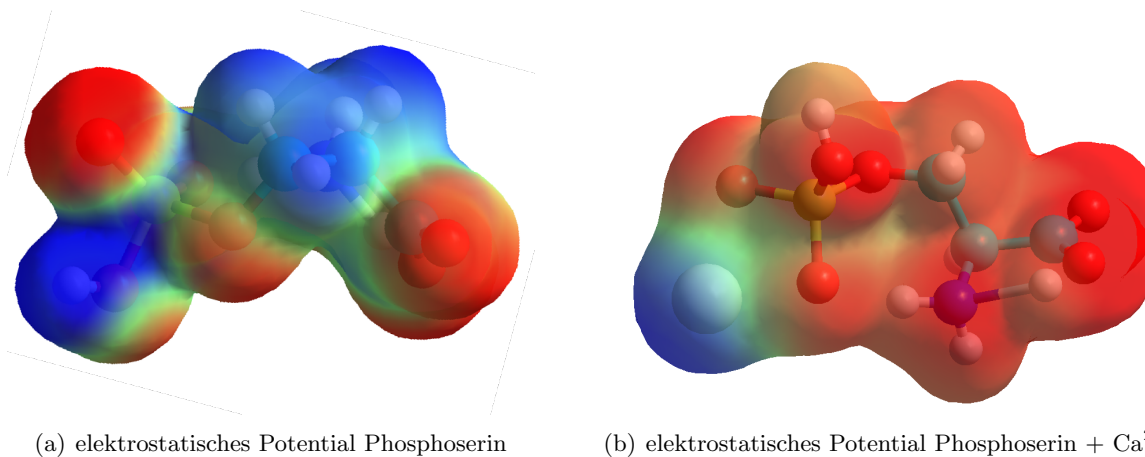


Abbildung 3.8: Elektrostatisches Potential des Phosphoserins an der v. d. Waals-Oberfläche. Die Farben geben das Potential, relativ zum restlichen Molekül wieder: Blau: positiv, Rot: negativ

3.2.2 Serin und Phosphoserin im Massenspektrometer

Um herauszufinden, welche Ionenkomplexe mit Phosphoserin und Calciumphosphat in wässriger Lösung am stabilsten sind, wurden die Massen mittels ESI-MS (Elektronenspray Massenspektrometrie) verschiedener Gemische wässriger Lösung aus Serin (kurz Ser) oder Phosphoserin (kurz P-Ser) mit Calciumionen und Calciumphosphat bestimmt.

Da die Proben als Auftragsmessung per Autosampler gemessen wurden, waren trotz Spülvorgang zwischen den Messungen, Reste anderer Proben sichtbar. Nach welchen Kriterien die Massen für eine Interpretation in Betracht gezogen wurden, ist im Anhang, Abschnitt 4 beschrieben. Die Ergebnisse werden in Spektren dargestellt, bei denen die Masse gegen die Zeit aufgetragen wurde. In Abständen von 50 sec. wurde die Spannung verändert, um ein breiteres Spektrum von Ionenkomplexen detektieren zu können. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MSight [178]. Auf den Abbildungen 3.9 und 4.2–4.6 sind die interpretierten Signale mit großen Zahlen beschriftet, die verworfenen mit kleinen. Eine Liste aller nicht interpretierten Signale befindet sich im Anhang, Abschnitt 4.16. Alle m/z -Werte geben einfach positiv geladene Ionenkomplexe wieder. Das Spektrum wurde auf einen Bereich von 100–500 Da begrenzt, um in dem relevanten Massebereich eine möglichst gute Auflösung zu erreichen.

Serin in Aq. dest. Serin wurde in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und als Vergleichsprobe gemessen. Die Präparation ist in Abschnitt 4 beschrieben, eine Tabelle der Massen mit Zuordnung der Komplexe ist in Abschnitt 4.10 und das Spektrum auf Seite 161 zu finden. Anhand der Intensitätsschwankung der Masse 106 im Laufe der Zeit erkennt man, wann die Probe eingespritzt wurde. Das Spektrum zeigt, dass Serin als Monomer (106) Dimer (175) und als Komplex (211) vorlag. Des Weiteren waren verschiedene Komplexe mit Na^+ und Ca^{2+} vorhanden, wobei die Komplexe mit Na^+ dominierten. Während das Na^+ zusammen mit dem Flussmittel in die Probe kam, zeigen die Massen 249 ($2 \times \text{Ser} + \text{Ca}^{2+}$) und 354 ($3 \times \text{Ser} + \text{Ca}^{2+}$), dass Ca^{2+} Vorhanden war, ohne dass es explizit hinzugegeben wurde. Das Fehlen des Signals bei 144 ($\text{Ser} + \text{Ca}^{2+}$) zeigt, dass die Konzentration des Calciums wahrscheinlich nicht hoch war, da bei deutlichen Ca^{2+} -Konzentrationen diese Masse auftrat (siehe Spektrum $\text{Ser} + \text{CaCl}_2$, Abschnitt 4.4). Das Calcium kam wahrscheinlich aus vorherigen MS-Läufen in diese Messung. Die Massen 175 und 193 zeigen, dass Serin per Peptidbindung Dimere gebildet hat, da genau die Masse 18 ($1 \text{ H}_2\text{O}$) zu einem Komplex aus zwei Serin fehlt. Die Häufigkeit der Komplexbildung des Serins mit sich selbst war bemerkenswert, die Masse 385 Da (zwei Ser-Dimere) erscheint fast mit der gleichen Intensität wie Masse 106 Da (Ser, reine Probensubstanz, siehe Abb. 4.2). Des Weiteren stabilisierten offenbar Kationen die Serinkomplexe. Mit dem $2 \times$ ($2 \times \text{Ser} + \text{Ca}^{2+}$) wurden Komplexe aus bis zu sechs Komponenten detektiert, größere Komplexe können nicht ausgeschlossen werden.

Phosphoserin in Aq. dest. Obwohl bei der Präparation ausschließlich Phosphoserin verwendet wurde, war bei m/z 106 (Serin) ein deutliches Signal vorhanden. Die Ursachen hierfür waren wahrscheinlich Verunreinigungen aus vorherigen Messungen. Die Masse 208

zeigt einen Phosphoserin- Na^+ Komplex an, ein Serin- Na^+ bei 128 war nicht erkennbar. Dies zeigt eine deutlich stärkere Affinität dieses Kations zum Phosphoserin. Das Gleiche gilt für das deutlich schwächere, aber dennoch klar erkennbare Phosphoserin- Ca^{2+} -Signal (224), bei gleichzeitigen Ausbleiben der Masse 144 (Serin- Ca^{2+}). Das Signal bei 371 (2 x Phosphoserin) war am stärksten, offenbar bildete das zwitterionische Phosphoserin einen stabilen Komplex mit sich selbst. Eine Auflistung der Massen ist in Tabelle 4.11 zu finden, das Spektrum der Serin- CaCl_2 Probe in Abbildung 4.3.

Serin mit CaCl_2 Nach der Zugabe von CaCl_2 war auch der Serin- Ca^{2+} -Komplex sichtbar; Komplexe aus mehreren Serin mit Na^+ bzw. Ca^{2+} zeigten jedoch ein stärkeres Signal. Das Signal des Phosphoserins war mit Beginn der Messung sichtbar, also vor Einspritzen der Probe, und kam somit aus einer vorherigen Messung. Viele verschiedene Ionenkomplexe aus Serin, Phosphoserin, Na^+ und Ca^{2+} wurden gebildet, es gab allerdings kein eindeutig stärkstes Signal. Tendenziell waren Komplexe mit Ca^{2+} etwas häufiger als Komplexe mit Na^+ . Eine Auflistung der Massen ist in Tabelle 4.12 zu finden, das Spektrum der Serin- CaCl_2 -Probe in Abbildung 4.4.

Phosphoserin mit CaCl_2 Auch in diesem Lauf war zusätzlich zur Probe noch etwas Serin vorhanden. Die starke Affinität des Phosphoserins zum Calcium zeigte sich an der Anwesenheit eines Phosphoserin- Ca^{2+} -Komplexes (Masse 224) bei gleichzeitigem Ausbleiben eines Serin- Ca^{2+} -Komplexes (Masse 144, siehe Abbildung 4.5). Auffällig in diesem Spektrum waren die starken Signale bei m/z 371 (2x P-Ser) und 393 (2x P-Ser + Na^+), die stabile Komplexe anzeigten. Phosphoserin- Ca^{2+} - und Phosphoserin- Na^+ -Komplexe kam gleichberechtigt nebeneinander vor. Die Peak-Liste findet sich in Tabelle 4.13, Spektrum siehe Abbildung 4.5.

Serin mit Calciumphosphat Neben den reinen Substanzen waren vor allem Komplexe aus mehreren Serin mit $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sichtbar. Diese zeigten ein stärkeres Signal als die einfachen Serin-Kation-Komplexe. Auch die Masse eines $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{HPO}_4^{2-}$ (m/z 137) war sichtbar. Die Signale sind in Tabelle 4.14 aufgelistet, das Spektrum ist auf Abbildung 4.6 dargestellt.

Phosphoserin mit Calciumphosphat Diese Probe zeigte die größte Anzahl von Ionenkomplexen, die als Wachstumskeim einer mineralischen Calciumphosphatphase angesehen werden könnten. So waren die Massen 137 ($\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$) sowie 175 ($\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-} + \text{Ca}^{2+}$) schwach sichtbar. Klare Signale ohne Phosphoserin, denen größere Calciumphosphat-Ionenkomplexe zugeordnet werden können, kamen nicht vor.

Die Massen 224 ($\text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$), 322 ($\text{P-Ser}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-}$) und 360 ($\text{P-Ser} + 2 \text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$) waren Hinweise auf das Wachstum eines Ionenkomplexes an einem Phosphoserin, der zu einem Kristallkeim führen könnte. Allerdings waren diese Signale recht schwach. Komplexe, die mehrere Phosphoserin und Serin enthalten, waren deutlich stärker. Die Intensität der Signale bei Massen größer 371 (Phosphoserin-Dimer) ließen mit steigender Größe des Komplexes nach.

Die Masse 246 war ein Hinweis auf einen $(2 \text{ P-Ser}^{2-} + \text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+)$ -Komplex. Die Anlagerung zweier positiv geladener Ionen war wahrscheinlich energetisch am günstigsten, wenn ein Kation an die Carboxylgruppe und das andere an die Phosphatgruppe gebunden wurde. Eine solche Anordnung ist auch für $(\text{Ca}^{2+} + \text{P-Ser}^{3-} + \text{Ca}^{2+})$ denkbar (m/z 262).

Der leicht erniedrigte pH-Wert von 5,5 erschwerte die Abgabe von Protonen von der Phosphatgruppe, was die Bildung von Komplexen mit mehreren Phosphatgruppen wie $\text{PO}_4^{3-} + 3 \text{ Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$ oder $\text{P-Ser} + 3 \text{ Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$ behinderte, da zu deren Bildung mehrere Protonen abgegeben werden müssten. Die Signale sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst, das Spektrum in Abbildung 3.9 dargestellt.

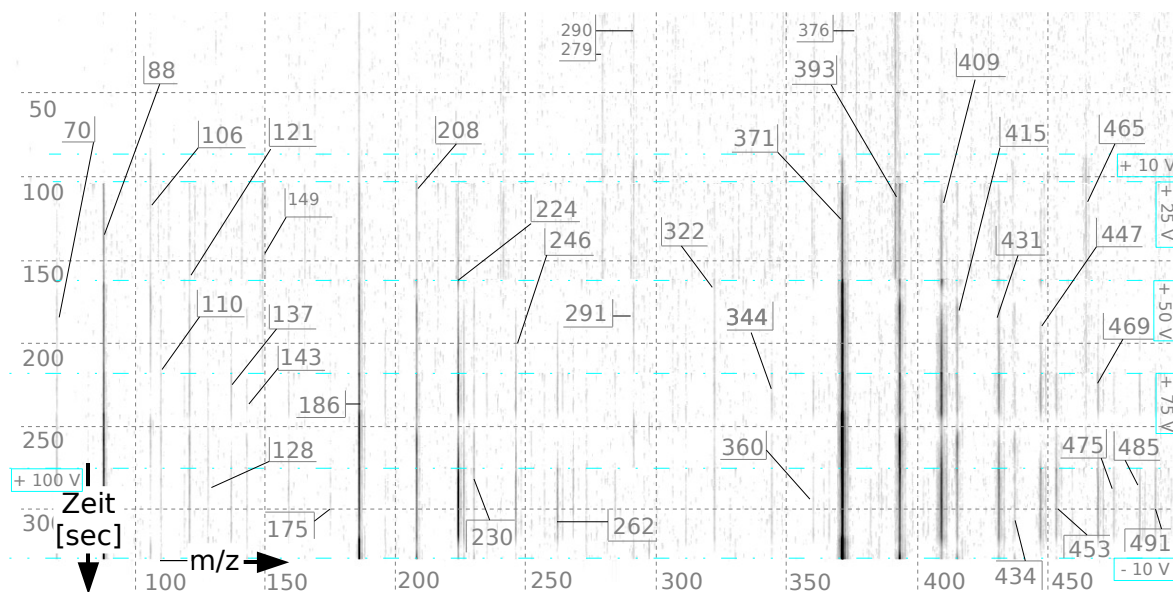


Abbildung 3.9: ESI-MS Lauf mit Phosphoserin in Calciumphosphatlösung

Tabelle 3.4: ESI-MS von Phosphoserin in Calciumphosphat-Lösung. I.=relative Intensität

m/z	Ionenspezies	I.	Kommentar
88	$\text{HPO}_4^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+}$ $\text{Ser}^+ - \text{H}_2\text{O}$	++++	Ladung: +2 Serin ohne Wasser aus vorherigen Läufen
106	Ser^+	++	
110	$\text{Ser} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+$	+	
121	$\text{Na}^+ + \text{H}_3\text{PO}_4$	++	
128	$\text{Ser} + \text{Na}^+$	++	
137	$\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	++	
143	$2 \text{Na}^+ + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	+	
149	$\text{Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	++	
175	$\text{PO}_4^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+}$ oder $2 \text{Ser} - 2 \text{H}_2\text{O}$	+	spekulativ wie zugegeben
186	P-Ser^+	++++	
208	$\text{P-Ser} + \text{Na}^+$	+++	
224	$\text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	+++	
230	$\text{P-Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	++	
246	$\text{P-Ser}^{2-} + \text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+$	++	
262	$\text{P-Ser}^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	+	
291	$\text{Ser} + \text{P-Ser}^+$	+	Komplex (keine Peptidbindung)
322	$\text{P-Ser}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-}$	++	
344	$\text{P-Ser}^+ + \text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$	+	
360	$\text{P-Ser} + 2 \text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$	++	
371	$\text{P-Ser} + \text{P-Ser}^+$	+++++	stärkstes Signal
393	$2 \text{P-Ser} + \text{Na}^+$	++++	
409	$\text{P-Ser} + \text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	++++	
415	$2 (\text{P-Ser} + \text{Na}^+)$	++	
431	$2 \text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+$	+++	
434	$2 \text{Ser} + \text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	++	
447	$\text{P-Ser}^- + \text{P-Ser}^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	+++	
453	$\text{P-Ser}^- + \text{P-Ser}^{2-} + \text{Ca}^{2+} + 2 \text{Na}^+$	++	
465	$3 \text{Ser} + \text{Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	++	
469	$\text{P-Ser}^+ + \text{P-Ser}^+ + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	++	
475	$\text{P-Ser} + \text{P-Ser}^+ + \text{Ser}$	++	Komplex
485	$\text{P-Ser}^{2-} + \text{P-Ser}^- + 3 \text{Ca}^{2+}$	++	
491	$\text{P-Ser}^+ + \text{P-Ser} + \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{Na}^+$	+	

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Ergebnisse von Serin und Phosphoserin im ESI-MS. CP=Calciumphosphat Stammlösung.

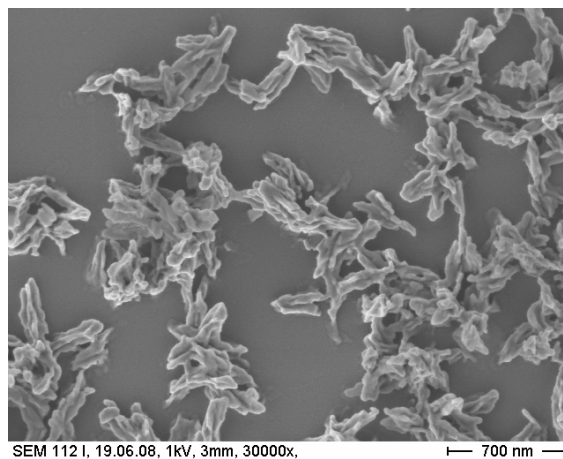
m/z	Ionenspezies	Ser in Aq. dest.	P-Ser in Aq. dest.	Ser + CaCl ₂	P-Ser CaCl ₂	Ser + CP	P-Ser + CP
88	HPO ₄ ²⁻ + 2 Ca ²⁺ [Ladung: +2]				++++	++	++++
106	Ser ⁺	++++			+++	++++	++
110	Ser - H ₂ O + Na ⁺		+++	+++			
121	Na ⁺ + H ₃ PO ₄				+++		++
128	Ser + Na ⁺	++		++	+		+
137	Ca ²⁺ + H ₂ PO ₄ ⁻				+	+	+
143	2 Na ⁺ + H ₂ PO ₄ ⁻						+
144	Ser ⁻ + Ca ²⁺			++			
148	Ser ²⁻ - H ₂ O + Na ⁺ + Ca ²⁺					+	
150	Ser ⁻ + 2 Na ⁺	+		++			
175	PO ₄ ³⁻ + 2 Ca ²⁺	++			++		+
186	P-Ser ⁺	+	++++	++	++++	+++	++++
193	Ser - H ₂ O + Ser Dimer	+					
204	P-Ser ⁺ + H ₂ O		++				
208	P-Ser + Na ⁺		+++		+++	++	+++
211	Ser + Ser ⁺	++	++	+	+	+++	
224	P-Ser ⁻ + Ca ²⁺		++	++	++	++++	+++
230	P-Ser ⁻ + 2 Na ⁺		++				++
246	P-Ser ²⁻ + Ca ²⁺ + Na ⁺						+
249	2 Ser + Ca ²⁺	++		++			
262	P-Ser ³⁻ + 2 Ca ²⁺					++	+
273	P-Ser-Ser ⁺		+		++	+	
287	Ser ⁻ + Ser ²⁻ + 2 Ca ²⁺	++		++			
291	Ser + P-Ser ⁺		++++		+		+
320	Ser-Ser + Na ⁺ + Ser			+			

Fortsetzung nächste Seite ...

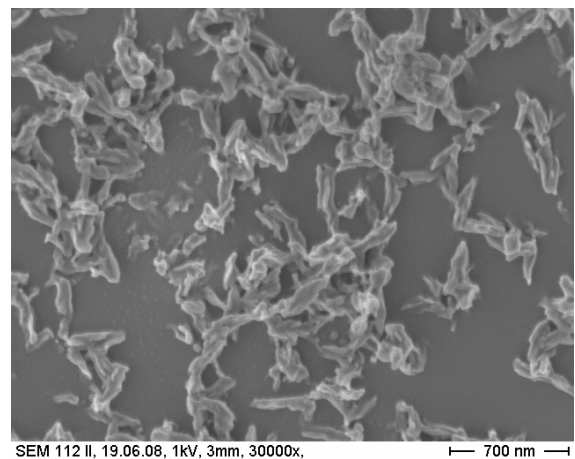
m/z	Ionenspezies	Ser in Aq. dest.	P-Ser in Aq. dest.	Ser + CaCl ₂	P-Ser CaCl ₂	Ser + CP	P-Ser + CP
322	P-Ser ⁺ + Ca ²⁺ + HPO ₄ ²⁻				+++	+	+
344	P-Ser ⁺ + Na ⁺ + Ca ²⁺ + PO ₄ ³⁻						+
354	Ser ⁻ + Ca ²⁺ + 2 Ser	+++		++			
358	Ser dimer+Na+Ser+Ca			+			
360	P-Ser + 2 Ca ²⁺ + PO ₄ ³⁻				++	+	+
371	P-Ser + P-Ser ⁺		+++++	+	+++++	+++++	+++++
382	3S + 3Na	+++++		++			
385	2 Ser-Ser	++					
392	Ser + Ser ⁻ + 2 Ca ²⁺	++		+++			
393	2 P-Ser + Na ⁺		++++	+	++++	+++	+++
398	P-Ser ²⁻ + 3 Ca ²⁺ + PO ₄ ³⁻					++	
409	P-Ser + P-Ser ⁻ + Ca ²⁺		+++		+++	+++	+++
415	2 P-Ser + Na ⁺		+++		++		+++
421	4x Ser	++		+			
430	(Ser + Ca) x3			++			
431	2 P-Ser ⁻ + Ca ²⁺ + Na ⁺				++	++	+++
434	2 Ser + P-Ser ⁻ + Ca ²⁺					+	+
437	P-Ser ⁻ x2 + 3 Na ⁺		++		++	+	
447	P-Ser ⁻ + P-Ser ²⁻ + 2 Ca ²⁺	++	+		++	+++	++
453	P-Ser ⁻ + P-Ser ²⁻ + Ca ²⁺ + 2 Na ⁺				+	+	+
465	3 Ser + Ser ⁻ + 2 Na ⁺	++	+++	++	+++	+++	+++
469	P-Ser ⁺ + P-Ser ⁺ + H ₂ PO ₄ ⁻				++	+	++
475	P-Ser + P-Ser ⁺ + Ser					+	+
485	P-Ser ²⁻ + P-Ser ⁻ + 2 Ca ²⁺	+			+	+++	+
491	P-Ser ⁺ + P-Ser + H ₂ PO ₄ ⁻ + Na ⁺	++			++	++	+
497	4 Ser + 2 Ca ²⁺	++		++	+		

3.2.3 AFM und REM

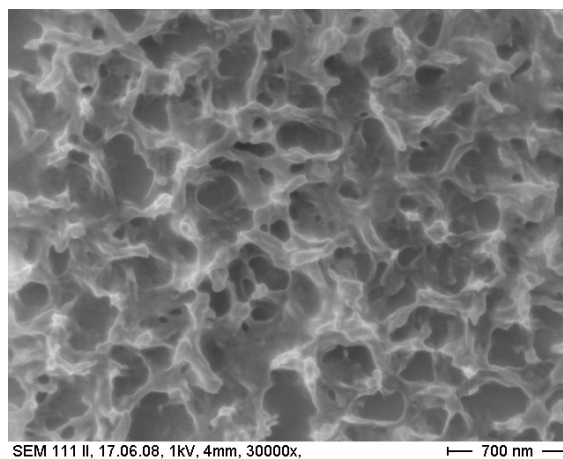
Der Einfluss von Serin und Phosphoserin auf den Keim einer festen Calciumphosphatphase in wässriger Lösung wurde untersucht, indem die in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Präzipitationsexperimente unter Beimischung verschiedener Mengen der Aminosäure wiederholt wurden. Der durch die Zugabe der Aminosäuren gefallene pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 angehoben. Auch der pH-Wert der Calciumphosphat-Stammlösung wurde mit NaOH von 6,7 auf 7,4 angehoben (siehe Präparation, Abschnitt 2.6.2). Die steigende Konzentration an Serin hatte beim Eintrocknen der Calciumphosphat-Stammlösung keinen großen Einfluss auf die Kristallitgröße und Form. Bei einer Konzentration von 0,01 mM Serin (Abb. 3.10 (b)) war praktisch kein Unterschied zu der Probe ohne Serin (Abb. 3.10 (a)) zu erkennen. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 1 mM Serin (Abb. 3.10 (d)) erschien die Übergänge zwischen den Kristalliten etwas weicher. Dies wurde als ein steigender Anteil einer amorphen Matrix aus Calciumphosphat und Serin gedeutet.



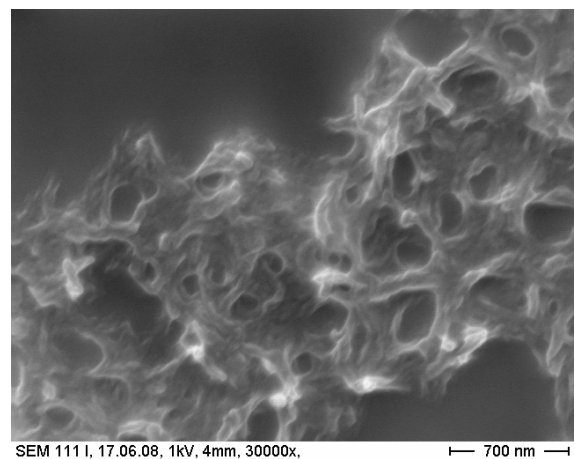
(a) Calciumphosphat ohne Zusatz



(b) Calciumphosphat mit 0,01 mM Serin.

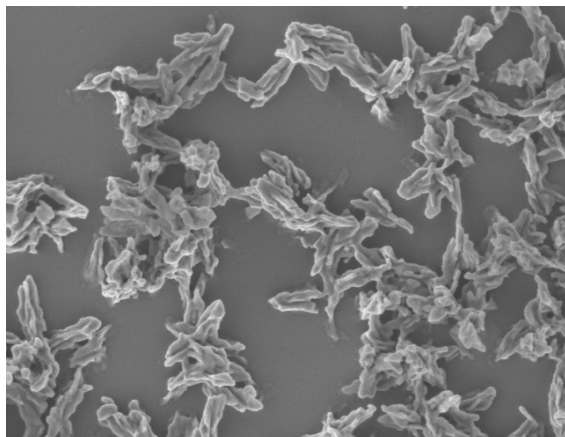


(c) Calciumphosphat mit 0,1 mM Serin

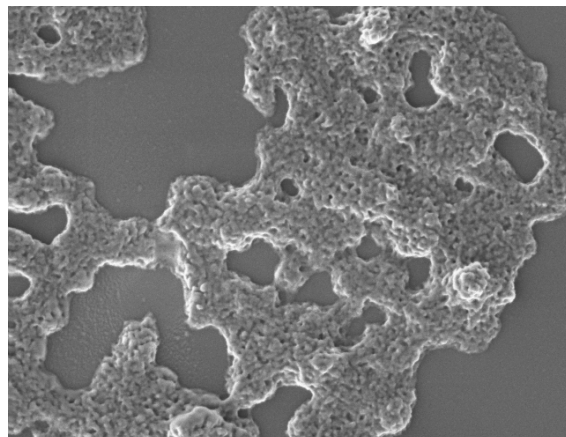


(d) Calciumphosphat mit 1 mM Serin

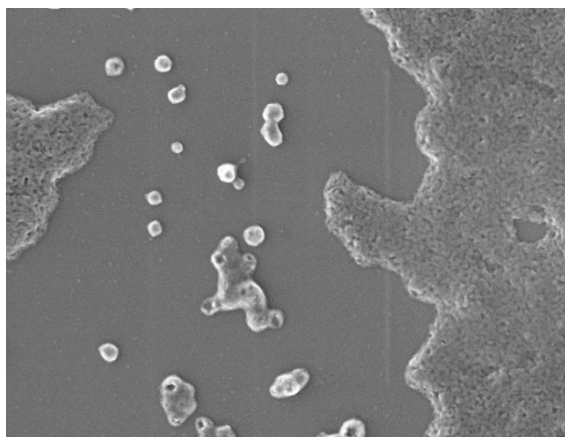
Abbildung 3.10: Calciumphosphat-Stammlösung mit steigender Serin-Konzentration eingetrocknet.



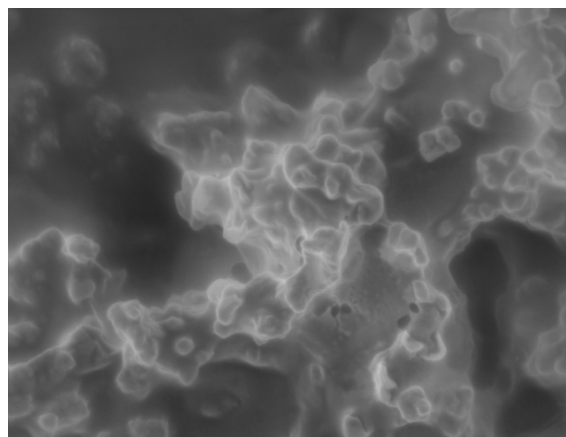
(a) Calciumphosphat ohne Zusatz.



(b) Calciumphosphat mit 0,01 mM Phosphoserin.



(c) Calciumphosphat mit 0,1 mM Phosphoserin.



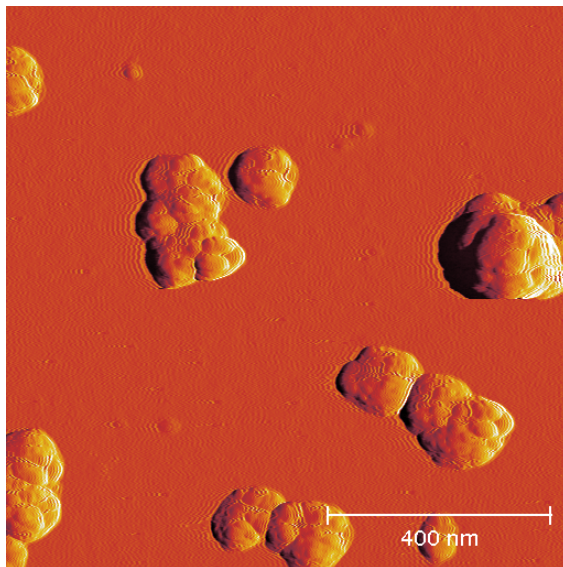
(d) Calciumphosphat mit 1 mM Phosphoserin.

Abbildung 3.11: Calciumphosphat-Stammlösung mit steigendem Phosphoserinegehalt auf Si-Wafer bei 37 °C getrocknet

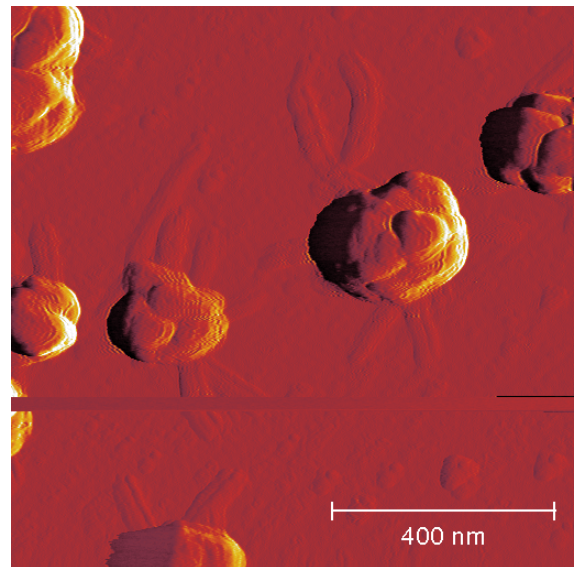
In Gegensatz dazu zeigten die gleichen molaren Konzentrationen von Phosphoserin einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Morphologie des Calciumphosphats. Die Zugabe zu 0,01 mM Phosphoserin verkleinerte die Kristallitgröße deutlich und eine weitere Steigerung der Phosphoserinkonzentration um das 10-fache verkleinerte die Kristallite an die Grenzen des mit dem REM auflösbaren Bereichs. Bei der höchsten hier verwendeten Phosphoserinkonzentration von 1 mM änderte sich das Erscheinungsbild grundlegend. Statt der nadeligen Strukturen traten globuläre Formen in einer Matrix auf (Präparation siehe Abschnitt 2.6.2).

Auch in den AFM-Untersuchungen zeigten die verschiedenen Konzentrationen von Serin keinen deutlichen Effekt auf die Morphologie der Calciumphosphatpartikel (Abbildungen 3.12). Im Falle des Phosphoserins führte die erhöhte Konzentration zu kleineren Partikeln. Bei einer 1 mM Phosphoserinkonzentration waren zwei unterschiedliche Partikelgrößen zu erkennen (Abbildung 3.13(d)). Der Durchmesser des Partikels (1) als Beispiel für die großen Partikel betrug ca. 168 nm. Der kleine Partikel rechts daneben (2) hatte einen Durchmesser von 58 nm und eine Höhe von 1 nm. Wahrscheinlich waren die Partikel in Lösung kugelförmig. Betrachtet

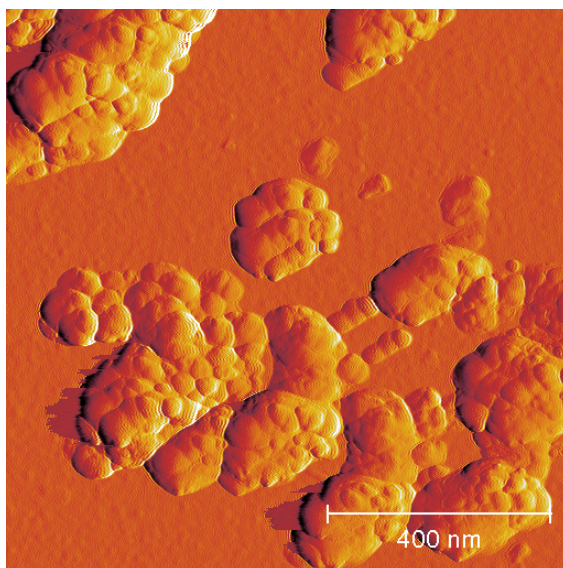
man die Objekte als Kugelkappe, kann über das Volumen der Kugeldurchmesser ausgerechnet werden. Bei dem größeren Partikel erhält man so einen Durchmesser von 26 nm, bei dem kleineren 8 nm.



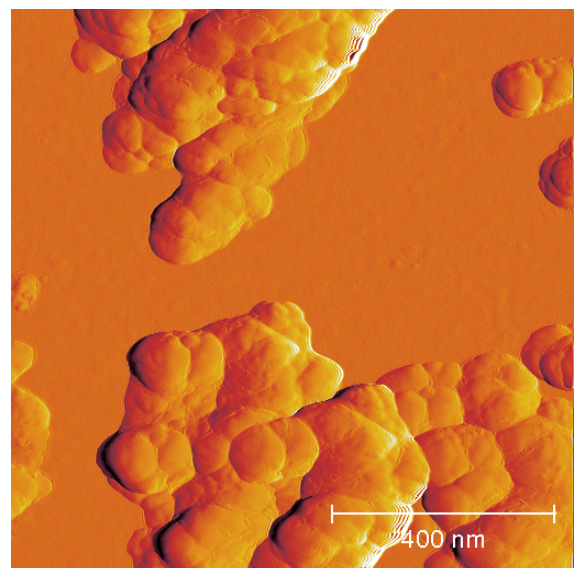
(a) Calciumphosphat ohne Zusatz



(b) Calciumphosphat mit 0.01 mM Serin.

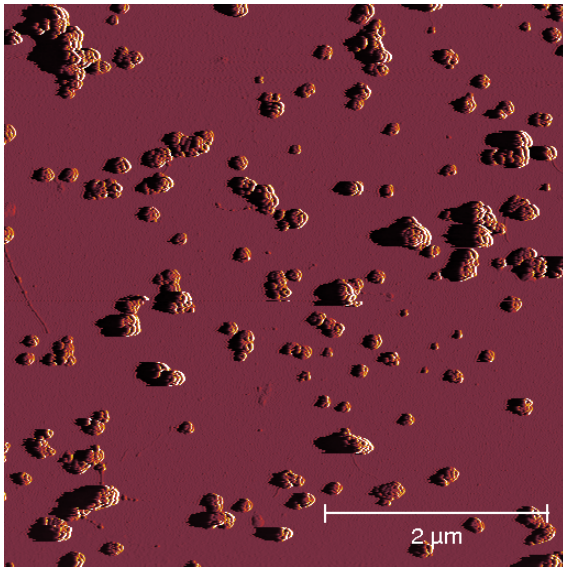


(c) Calciumphosphat mit Serin: 0.1 mM.

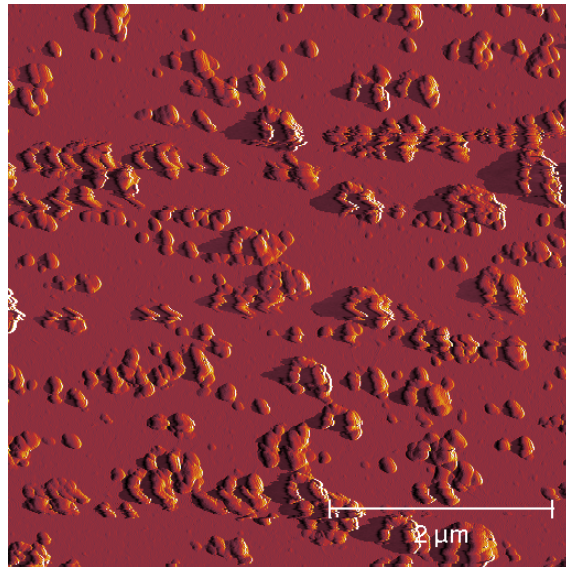


(d) Calciumphosphat mit Serin: 1 mM.

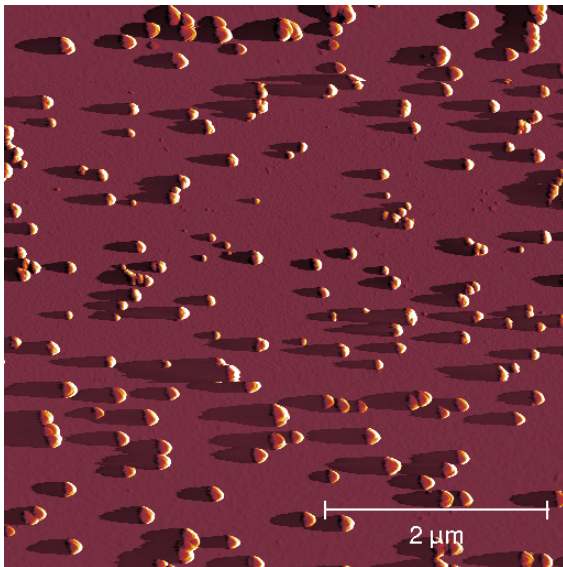
Abbildung 3.12: Die steigende Konzentration an Serin führt zu runderen Formen, hat aber insgesamt keinen großen Einfluss auf die Morphologie der Partikel.



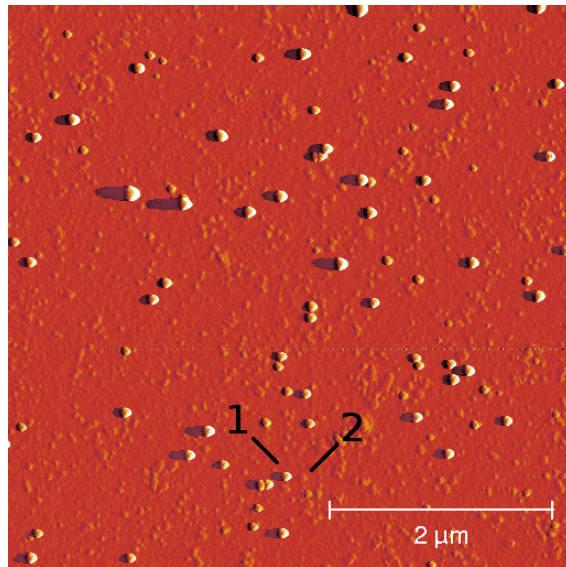
(a) Calciumphosphat ohne Zugaben



(b) Calciumphosphat mit 0.01 mM Phosphoserin



(c) Calciumphosphat mit 0.1 mM Phosphoserin



(d) Calciumphosphat mit 1 mM Phosphoserin

Abbildung 3.13: Calciumphosphat mit Phosphoserin im AFM. Die steigende Konzentration an Phosphoserin führt zu kleineren Partikeln.

3.2.4 Calciumphosphat mit Phosphoserin in NMR

Um die Wechselwirkung von Phosphoserin mit Calciumphosphat näher zu charakterisieren, wurde Phosphoserin (P-Ser), aus Lösung ausgefälltes Calciumphosphat (CP_{Lsg}) sowie das Reaktionsprodukt einer Lösung aus Phosphoserin und Calciumphosphat (P-Ser CP_{Lsg}) ausgefällt, abzentrifugiert und gefriergetrocknet und dann mittels Festkörper-NMR untersucht (detaillierte Präparation s. Seite 41). Bei dem Phosphoserin handelte es sich um die ^{13}C und ^{15}N angereicherte Form. Von diesen Proben wurden auch REM-Abbildungen, FT-IR- und XRD-Spektren angefertigt.

Im freien Zustand lag Phosphoserin als Zwitterion vor: $^{-}\text{O}_3\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_3^{+})-\text{COOH}$. Die Resonanzfrequenz des gemessenen Kerns sowie die Rotationsfrequenz der Probe sind jeweils in den Spektren vermerkt. In allen Grafiken stellt das schwarze Spektrum Phosphoserin, das rote Spektrum Calciumphosphat mit Phosphoserin und das blaue Calciumphosphat dar.

^1H Das ^1H -Spektrum des reinen Phosphoserins zeigte wie erwartet drei starke Signale bei 16,9 (COOH), 12,9 (OPO₃H) und 8,3 (CHNH₃) ppm. Die Signale der CH- und CH₂-Gruppen lagen in der breiten Flanke zwischen 5 und 0 ppm (Abbildung 3.14(a), schwarzer Graph). Im Gegensatz dazu waren in der calciumphosphathaltigen Probe (P-Ser CP_{Lsg}) die Signale bei 16,9 und 12,9 ppm nicht mehr vorhanden, sondern nur noch eine schwache Schulter bei 15 ppm. Dies spricht dafür, dass die Carboxyl- und die Phosphatgruppe des Phosphoserins in dieser Verbindung nicht mehr protoniert waren. Das breite Signal mit einem Maximum bei ca. 7,6 ppm wurde durch Wasser hervorgerufen, die Quelle der beiden schmalen Signale bei 1,3 und 0,8 ppm ist nicht geklärt (Abbildung 3.14(a), roter Graph).

^{15}N Das ^{15}N Signal des N im Phosphoserin wurde durch die Anwesenheit von Calciumphosphat von 347,3 ppm nach 340,2 ppm verschoben. Dieses Signal war asymmetrisch und bestand aus drei nicht aufgelösten Linien. Offenbar trat der Stickstoff in dieser Probe in verschiedenen Umgebungen auf. Der Grund für die Verschiebung um 7 ppm ist nicht geklärt (Abbildung 3.14(b)).

^{31}P Das ^{31}P -Spektrum des Phosphoserins zeigte ein schmales Signal der Phosphatgruppe bei 0,2 ppm. Die Calciumphosphatprobe zeigte zwei Signale, ein großes bei 1,8 und ein kleines bei 6,9 ppm. Dazwischen waren im Bereich zwischen 1 und 4 ppm noch einige kleinere, breite und nicht aufgelöste Signale zu erkennen. Das Signal bei 1,8 ppm lag in einem typischen Bereich für Calciumorthophosphate. Die Natur des kleineren Signals bei 6,9 ppm ist nicht restlos geklärt, es könnte sich um Hydrogenphosphate HPO_4^{2-} handeln. Das Spektrum der P-Ser CP_{Lsg} zeigte nur noch ein relativ breites Signal mit einem Maximum bei 0,2 ppm. Das Signal war nicht symmetrisch und setzte sich aus mehreren Linien zusammen. Die wichtigsten Informationen, die aus diesem Spektrum gelesen werden können: (1) Der Anteil der Kopfgruppe des Phosphoserins am gesamten Phosphat der Probe (P-Ser CP_{Lsg}) war relativ groß. Er bewegte sich in einer Größenordnung zwischen 30 und 60%. Dies wurde an Fitversuchen festgestellt, bei denen die Linie des REPT $\text{I1}=0$ unter die Linie des single pulse Spektrums

Tabelle 3.6: Banden der ^{13}C -NMR Spektren und ihre Zuordnung zur ihrer näheren Umgebung

Gruppierung	P-Ser	P-Ser CP_{Lsg}
CHNH_3	55,4	56,8
CH_2OP	64,0	64,5
COO	170,3	173,7

gelegt wurde.

(2) Das Phosphat der Kopfgruppe lag nicht isoliert vom restlichen Phosphat vor. Bei längeren Übertragungszeiten der Magnetisierung von Kohlenstoff zu Phosphor wurde nicht nur die Kopfgruppe magnetisiert, sondern auch anderes Phosphat. Daraus resultiert eine Verschiebung des Signalmaximums des REPT-Signals bei längeren Übertragungszeiten. Wenn das Phosphat jedoch isoliert von anderen Phosphateinheiten wäre, dann dürfte keine Magnetisierung übertragen werden.

^{13}C Die ^{13}C -Spektren der P-Ser und P-Ser CP_{Lsg} Proben zeigten beide die Signale der drei Kohlenstoffatome des Phosphoserins. Alle kleineren mit * markierten Signale waren Rotationsseitenbänder. Die Signale der Probe P-Ser CP_{Lsg} waren hin zu höheren ppm-Werten verschoben und deutlich breiter als die der reinen P-Ser Probe. Die Deprotonierung der Carboxylgruppe im P-Ser CP_{Lsg} verschob das entsprechende Signal um einige ppm. Dies steht im guten Einklang mit den Ergebnissen der ^1H -Spektren, in denen kein Signal einer Carbonsäuregruppe mehr gefunden wird.

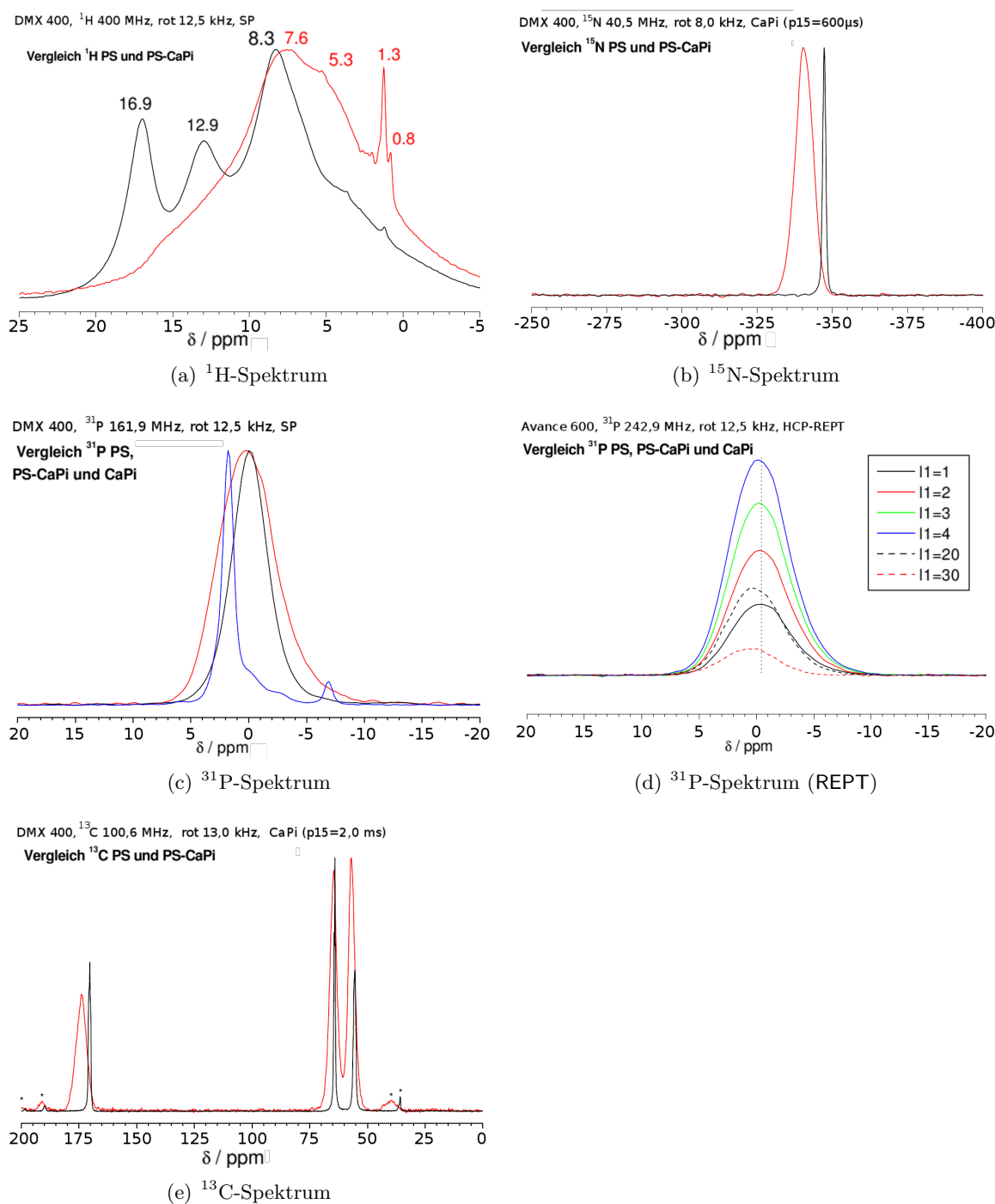


Abbildung 3.14: NMR-Spektren von Phosphoserin (P-Ser, schwarz), Phosphoserin mit Calciumphosphat (P-Ser CP_{Lsg} , rot) und Calciumphosphat (CP_{Lsg} , blau)

3.2.5 Infrarotspektroskopie von Calciumphosphat mit Phosphoserin

Um einen Einblick in die Wechselwirkung der funktionellen Gruppen des Phosphoserins mit Calciumphosphat zu gewinnen, wurden FT-IR-Spektren von Phosphoserin (P-Ser), Calciumphosphat ($\text{CP}_{\text{HAp}} = \text{HAp}$ Pulver von Merk; $\text{CP}_{\text{Lsg}} =$ aus Lösung ausgefälltes Calciumphosphat) sowie einer trockenen Mischung aus P-Ser und CP_{HAp} ($\text{P-Ser CP}_{\text{tr}} = 1:1$) und einer aus Lösung ausgefällten Mischung aus Phosphoserin und Calciumphosphat ($\text{P-Ser CP}_{\text{Lsg}}$) aufgenommen. Die beiden aus Lösung ausgefällten Proben wurden identisch zu den Proben für die NMR-Messungen präpariert (siehe Abschnitt 2.3.1 und 2.6). Eine ausführliche Tabelle mit den Frequenzen, deren Intensitäten sowie der Zuordnung der Schwingungsmodi ist in Abschnitt 4.9 zu finden.

Simulierte IR-Spektren

Auf der Basis modellierter, geometrieoptimierter Molekülkomplexe wurden theoretische IR-Spektren für einen $[\text{CaHPO}_4]_2$ -Komplex (kurz: CP_{sim} , sim für Simulation, siehe Abbildung 3.15(a)) und einen Komplex aus zwei Phosphoserin mit zwei Calcium und einem Phosphat (kurz: $\text{PS CP}_{\text{sim}}$, siehe Abbildung 3.15(b)) berechnet. Die Darstellung dieser berechneten Spektren erfolgt zusammen mit den Messungen in den Abbildungen 3.16 und 3.17. Die simulierten Spektren zeigten zwar stellenweise Diskrepanzen im Vergleich zu den Messungen der Probe, haben aber den Vorteil, dass der Schwingungstyp einer bestimmten Frequenz genau bestimmt werden konnte. Hierbei ist zu beachten, dass bei vielen Frequenzen das ganze Molekül bzw. der gesamte Komplex mitschwang, aber meist eine bestimmte Gruppe die Schwingung bei einer Frequenz dominierte. Diese Gruppe wurde dann im folgenden Text und in der Tabelle 4.9 angegeben. Im folgenden Abschnitt werden die simulierten Spektren CP_{sim} und $\text{PS CP}_{\text{sim}}$ mit den Messungen und den Literaturdaten verglichen.

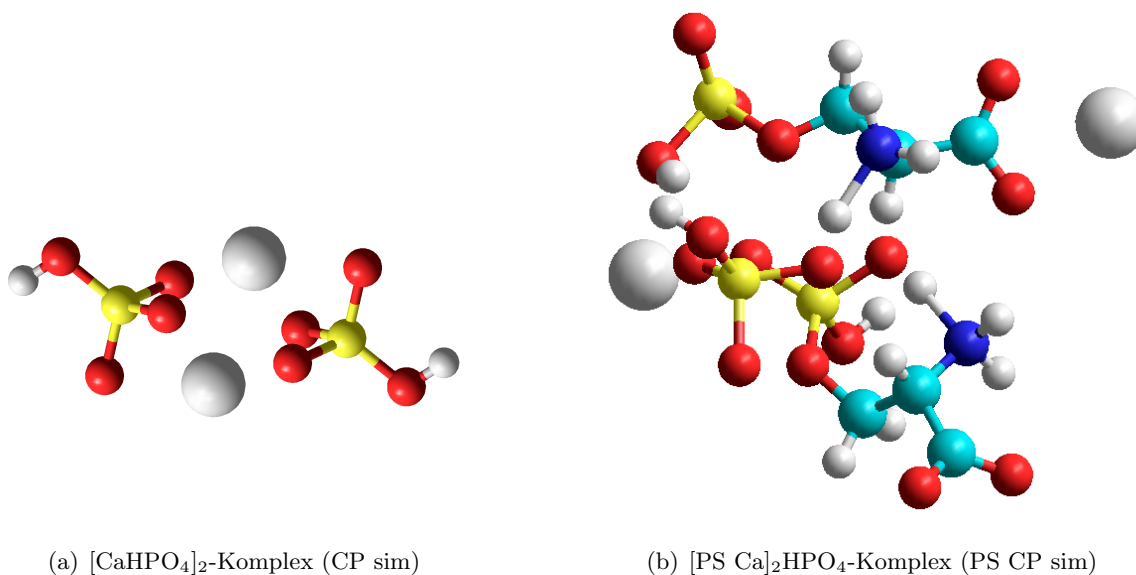


Abbildung 3.15: Molekülkomplexe der simulierten IR-Spektren

100-640 sim Das simulierte IR-Spektrum des $[\text{CaHPO}_4]_2$ -Komplexes zeigte bei Wellenzahlen kleiner 480 cm^{-1} eine sehr gute Korrelation mit den Daten von *Boldeskul et al.* [25]. In diesem Bereich schwingen häufig $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{O-PO}_3^{2-}\text{H}$ Verbindungen. Auch die Signale des PS CP_{sim} Komplexes wurden in diesem Frequenzbereich vor allem durch P-O-Schwingungen, aber auch von C-O verursacht.

Die CP_{sim} -Signale bei 542 , 554 und 633 cm^{-1} stimmten etwa mit den gemessenen des CP_{Lsg} -Spektrums überein und waren jeweils auf ω -, γ - und δ -Schwingungen des Phosphats zurückzuführen. In der PS CP_{sim} Simulation traten zwischen 540 und 640 cm^{-1} neben den Phosphatschwingungen auch Schwingungen des gesamten Moleküls auf, so auch bei dem deutlichen Signal bei 588 cm^{-1} . In den detaillierten IR-Untersuchungen von Serin durch *Lambie et al.* [138] wurden für den Wellenlängenbereich von 500 bis 800 cm^{-1} vor allem γ C-H, C-C und C-O Schwingungen angegeben.

640-950 sim Der mit dem PS CP_{sim} Komplex simulierte Peak bei 656 cm^{-1} fand seine experimentelle Entsprechung in dem kleinen, aber scharfen Signal bei 668 cm^{-1} der phosphoserinhaltigen Proben. Die Simulation zeigte, dass alle Moleküle im Komplex schwingen, wobei sich die $-\text{PO}_4\text{-C-C-COO}^-$ -Kette ziehharmonikaartig bewegte. Die nächsten aus der Literatur bekannten Signale liegen bei 643 cm^{-1} für Serin, welches durch die Kohlenstoffkette und die Carboxylgruppe hervorgerufen [138] wird, bei 657 cm^{-1} durch eine P-O Streckschwingung [25, Simulation eines $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ Komplexes] und bei 668 cm^{-1} [67, Simulation von PO_4^{3-}]. Trotz der verschiedenartigen Umgebungen der drei phosphoserinhaltigen Proben war keinerlei Verschiebung der Frequenz zwischen den gemessenen Proben zu erkennen, was auf einen von der Umgebung unabhängigen Schwingungsmodus hinweist, wie ihn die Simulation vorschlägt.

Bei 714 cm^{-1} zeigte die PS CP_{sim} eine ω C-COO⁻ Schwingung, der in den Messungen ein Signal bei 705 und 720 cm^{-1} CP_{Lsg} , bei 732 cm^{-1} P-Ser und bei 745 cm^{-1} PS CP_{tr} entsprach. Serin zeigte bei 723 , 736 und 749 cm^{-1} Signale, die auf C-C und C-O Schwingungen beruhen [138].

Die PS CP_{sim} Simulation zeigte bei 778 und 818 cm^{-1} Signale, die die experimentellen Messungen bei 800 PS, 812 und 824 cm^{-1} PS CP_{tr} sowie 818 cm^{-1} PS CP_{Lsg} einrahmten. Die simulierten Signale resultierten vor allem aus ν_s OP-O₃ Schwingungen, während die restliche Aminosäure schwach mitschwang. In der Arbeit von *Lambie et al.* werden hier schwache C-C und C-O Schwingungen des Serins diskutiert. Ab 800 cm^{-1} traten bei Serin vermehrt auch N-H Schwingungen auf [138].

Die PS CP_{sim} Schwingungen von 836 bis 904 cm^{-1} beruhten auf P-O, C-O und, zu einem geringen Anteil auf N-H Schwingungen. Auch die restliche Aminosäure schwang bei diesen Frequenzen untergeordnet mit. Abgesehen von den Phosphatschwingungen wurden zwischen 840 und 920 cm^{-1} die gerade erwähnten Schwingungsmodi auch bei Serin beobachtet [138].

In der CP_{sim} Simulation war im Frequenzbereich von 650 - 1000 cm^{-1} praktisch kein Signal vorhanden, nur eine schwache ν_s OP-O₃ bei 802 cm^{-1} . Die HAp-Probe zeigte ein schwaches Signal bei 824 cm^{-1} , welches vermutlich diesem Schwingungsmodus entspricht.

950-1200 sim Die Simulation der beiden CP-Dimere (CP_{sim}) zeigte in diesem, durch Phosphatschwingungen dominierten Bereich, drei Signale bei 1024, 1027 und 1068 cm^{-1} , die alle auf P-O Streckschwingungen beruhten und sehr gut mit dem experimentellen Signal von 1000 bis 1150 cm^{-1} der CP_{Lsg} -Probe übereinstimmte.

In der Probe mit Phosphoserin traten neben den P-O Streckschwingungen auch mit dem C-Rückgrad assoziierten Schwingungen und Vibrationen der Aminogruppe auf. Diese fanden in den phosphoserinhaltigen Proben ihre Entsprechung in den kleinen Signalen um 980 ± 20 und $1150 \pm 20\text{ cm}^{-1}$, die ober- und unterhalb des großen Phosphatsignals um $1050 \pm 50\text{ cm}^{-1}$ auftraten.

1200-1690 sim Oberhalb von 1200 cm^{-1} dominierten in der PS CP_{sim} Simulation verschiedene Modi der δ C-H und δ N-H Schwingungen bis 1690 cm^{-1} . Im Spektrum von CP_{sim} lag das Signal mit der höchsten Wellenzahl bei 1425 cm^{-1} und wurde durch eine δ P-O-H Schwingung verursacht. Diese stimmte mit den OH Schwingungen des Wassers überein, welche in Form von Rauschen in den experimentellen Spektren zu finden sind.

In der PS CP_{sim} Simulation schwingen von 1219 bis 1337 cm^{-1} vornehmlich die C-N-H und C-H Gruppen. Auch *Lambie et al.* haben in diesen Spektralbereich für Serin vor allem CH_2 , OH und NH Schwingungen ermittelt [138]. In den gemessenen Proben fanden sich in diesem Frequenzbereich die starken Doppelsignale in PS CP_{tr} bei $1260 + 1276\text{ cm}^{-1}$ und PS $1244 + 1256\text{ cm}^{-1}$ sowie das schwache Signal bei 1267 cm^{-1} der PS CP_{Lsg} Probe.

Bei Wellenzahlen größer 1300 cm^{-1} traten verschiedene (C)-H-Schwingungen in den Vordergrund. Die drei starken Signale aus der PS CP_{sim} Simulation bei 1337 , 1366 und 1424 cm^{-1} resultierten jeweils aus den Schwingungen fast aller vorhandenen H-Atome. Auch Serin schwingt mit CH_2 und OH Gruppen in diesem Wellenlängenbereich [138]. *Leberle et al.* interpretieren eine Verschiebung von 1467 nach 1477 cm^{-1} als Zustandsänderung von fixierten zu frei beweglichen CH_2 -Ketten im Phosphatidylserin [144].

Von 1500 bis 1600 cm^{-1} schwingen in der PS CP_{sim} vor allem die C-H und C-N-H Gruppen. In der Literatur werden für diesen Frequenzbereich vor allem Schwingungen der Aminogruppe angegeben [138, 144]. Oberhalb von 1600 cm^{-1} kam ein deutlicher Anteil einer ν O-C-O Schwingung hinzu.

1690-4000 sim Der in Messungen meist auftretende CO_2 -Doppelpeak bei 2340 und 2360 cm^{-1} zeigte sich in der PS CP_{sim} durch die Schwingung der Carboxylgruppen des Phosphoserins und war zu etwas kleineren Wellenzahlen nach 2120 und 2206 cm^{-1} verschoben. Im Modell schwingen bei den genannten Frequenzen ν_{as} C-O, δ_{s} N-H und δ_{s} C-H, was die Abweichung zur Messung erklärt.

Von 2210 bis 3100 cm^{-1} gab es einen Frequenzbereich, in dem in der Simulation keine Signale auftreten. Erst bei 3110 cm^{-1} trat die ν_{s} N- H_2 in den Vordergrund, von 3490 bis 3710 cm^{-1} schwingen in erster Linie ν C-H, danach folgten bis über die 4000 cm^{-1} noch einmal N-H Schwingungen.

Bei *Lambie et al.* schwingen ν CH₂ Gruppen von 2840 bis 3000 cm⁻¹ und die Amino-
gruppen von 3300 - 3500 cm⁻¹, oberhalb dieser Wellenzahlen werden OH dedektiert [138].
Leberle et al. berichten zwischen 2250 und 3350 cm⁻¹ von N-H Streckschwingungen [144].
Die Übereinstimmung der schwingenden Gruppen mit den entsprechenden Frequenzbereichen
zeigt, dass die in der Simulation charakterisierten Schwingungsmodi mit den publizierten gut
übereinstimmen und die Simulationen ein funktionierendes Arbeitsmodell für die jeweiligen
Komplexe sind.

Gemessene FT-IR-Spektren

Die Zuweisung der gemessenen Frequenzen zu bestimmten molekularen Gruppen im Komplex
und deren Schwingungsmodi erfolgte auf Grund der Nähe einer aus der Literatur oder der
Simulation bekannten Frequenz. Die Daten aus der Literatur stammen von gemessenen
Spektren verschiedener Calciumphosphate, Serin, Phosphoserin und Phosphatidylserin sowie
von Daten aus simulierten Spektren von Serin, eines Calciumphosphatkomplexes und von
Phosphat. Auch die selbst errechneten, im vorherigen Abschnitt beschriebenen Daten liefern
wertvolle Hinweise auf verschiedene Schwingungsmodi.

410-650 Den Signalen bei 418 cm⁻¹ und 419 cm⁻¹ konnten O-P-O(H) Schwingungen
zugewiesen werden [25, 136]. Den Banden 455 und 459 cm⁻¹ wurden auf Grund der Nähe
zu dem simulierten Band bei 450 cm⁻¹ δ P-O und δ C-O Schwingungen zugeordnet. In den
Proben mit Phosphoserin waren diese im Gesamtvergleich sehr schwachen Schwingungen
etwas stärker als in den Proben aus reinem Calciumphosphat.

Eine typische P-O Streckschwingung bei 472 cm⁻¹ war vor allem in den phosphoserin-
haltigen Proben sichtbar, in den reinen Calciumphosphatproben war diese Schwingung so
klein, dass sie im Spektrum kaum zu erkennen ist. Auch die starken Adsorptionsbande des
Phosphoserins zwischen 480 und 500 cm⁻¹ waren vermutlich phosphoserinspezifische P-O und
C-O Schwingungen, da sie in den reinen Calciumphosphatproben nicht erschienen, und die
nächsten zuzuordnenden Banden die der δ C-O Schwingung des Serins bei 507 cm⁻¹ [138]
und die des Phosphats bei 471 cm⁻¹ [147] sind.

Die Schwingungen in den phosphoserinhaltigen Proben zwischen 500 und 540 cm⁻¹ waren,
wenn von den Serinschwingungen ausgegangen wird, kombinierte δ C-O + ν C-C Schwingun-
gen [138]. Bei den Wellenzahlen größer 560 cm⁻¹ spielen zusätzlich δ O-P-O Biegeschwingungen
eine Rolle [164]. Das starke Signal in PS CP_{Lsg} bei 550 cm⁻¹ war höchstwahrscheinlich das
Resultat der Überlagerung der Phosphatschwingungen in den Spektren der Proben aus reinem
Calciumphosphat und den phosphoserinhaltigen Proben. Die Signale bei 563 cm⁻¹ der P-Ser,
und 600 cm⁻¹ der Calciumphosphatproben, führten bei Vermischung der Substanzen (PS
CP_{Lsg}) zu einem kleinen Plateau von 570-601 cm⁻¹. Des weiteren führte das Calciumphosphat
anscheinend bei engerer Bindung zu Phosphoserin zu einer Erhöhung der δ C-O Frequenz
von 526 (P-Ser) über 528 (PS CP_{tr}) zu 536 cm⁻¹ (PS CP_{Lsg}), wobei auch die Intensität des
Signals nachließ. Auch in den simulierten IR-Spektren kam es mit Einführung der Ca²⁺-Ionen

zu einer Verschiebung zu größeren Wellenzahlen bei δ -Schwingungen (s. S. 51). Die Simulation bezog sich zwar auf P-O Schwingungen, es wird jedoch an dieser Stelle angenommen, dass hier der physikalische Effekt für eine Carboxylgruppe der Gleiche ist.

Hierbei führte vermutlich die Deprotonierung der Carboxylgruppe, wie sie in den NMR-Messungen nachgewiesen wurde, in der PS CP_{Lsg}-Probe zu einer schnelleren δ -Schwingung des C-O. Auch kann eine Frequenzerhöhung durch die Stabilisierung durch ein Gegenion auftreten, wie dies bei der Wechselwirkung zwischen H₂O und PO₄³⁻ der Fall ist [67]. Als Gegenion könnte hier ein Ca²⁺ wirken. Ob die Reduzierung der Signalstärke eine Folge der chemischen Wechselwirkung oder der geringeren Phosphoserinkonzentration war, bleibt unklar.

Das Signal zwischen 560 und 570 cm⁻¹ war eine δ O-P-O Schwingung, die mit geringen Verschiebungen in allen Proben auftritt [164, 147]. Ein typisches Signal, das bei der Wechselwirkung einer δ O-P-O Schwingung mit Calcium auftrat, ist die Schwingung bei 601 cm⁻¹, dieses fehlte in der reinen P-Ser Probe [136, 164].

Der Wellenzahl 630 cm⁻¹ wurde die OH-Schwingung des HAp zugewiesen, das durch ihr Auftreten in den HAp-haltigen Proben nachvollzogen wird [210, 136, 73]. Ihr Fehlen in der PS CP_{Lsg} Probe ist ein Hinweis, dass sich kein HAp gebildet hatte. Die CP_{Lsg} Probe zeigte bei 632 cm⁻¹ auch diese charakteristische Schwingung, allerdings nur sehr schwach. Zu einem geringen Anteil wurden vermutlich OH-Gruppen in das Calciumphosphat dieser Probe eingebaut. Zu den IR-Schwingungen mit Wellenzahlen kleiner 600 cm⁻¹ mischen sich im Allgemeinen auch Translationsschwingungen des Wassers [136].

650-940 Das Signal bei 668 cm⁻¹ trat bei allen phosphoserinhaltigen Proben ohne Verschiebung auf, fehlte aber bei den Proben aus reinem Calciumphosphat. Aus den Ergebnissen der Simulation (s. S. 73) wurde eine ziehharmonikaartige PO₄-C-C-COO⁻ Schwingung vermutet.

Ein weiterer typischer Phosphoserinpeak trat bei 732 cm⁻¹ auf, der wahrscheinlich den ν C-C + ν C-C + ν C-O Schwingungen des Serins entspricht [138]. Interessanterweise verschiebt sich dieser bei trockener Mischung mit Calciumphosphat zu kürzeren Wellenlängen (745 cm⁻¹), während er bei der Präzipitation aus Lösung zu längeren (720-705 cm⁻¹) wanderte.

Eine mögliche Erklärung hierfür kann bei der ersten Verschiebung die Stabilisierung durch ein Ca²⁺ als Gegenion, bei der zweiten die Deprotonierung der Carboxylgruppe sein, die, wie die NMR-Untersuchungen zeigen, bei der P-Ser Probe protoniert war, nicht aber bei der PS CP_{Lsg}-Probe. In der IR-Simulation der Phosphatgruppe (s. S. 73) führte die Deprotonierung auch zu einer Verringerung der Wellenzahl einer ν -Schwingung (s. S. 48).

Eine ähnliche Ursache wurde für die Verschiebung der Peaks von 800 (PS) → 812-824 (PS CP_{tr}) → 788 cm⁻¹ (PS CP_{Lsg}) angenommen. In diesem Falle war allerdings die Aminogruppe (γ NH₂ + γ OH [138, 226]) für das Signal verantwortlich. Auch hier zeigte das NMR Spektrum bei der CP PS_{Lsg} eine veränderte Umgebung für die funktionelle Gruppe.

Die beiden Signale bei 876 und 903 cm⁻¹ der P-Ser Probe wurden durch die trockene Mischung mit HAp zu 892 und 920 cm⁻¹ verschoben. Beim Phosphoserin waren hierfür γ NH₂ und ν C-C + ν C-O [138] Schwingungen verantwortlich. Auch hier beschleunigten höchstwahrscheinlich Gegenionen die Schwingung. In der PS CP_{Lsg}-Probe gab es ein schwaches

Signal bei 878 cm^{-1} . In den phosphoserinfreien Proben war ein sehr schwaches, breites Signal bei 875 cm^{-1} zu erkennen. Dies wurde als ein Hinweis auf die Anwesenheit geringer Mengen HPO_4^{2-} gewertet [136]. Allerdings traten bei 883 cm^{-1} auch Carbonatschwingungen auf [136, δ und $\nu\text{ CO}_3^{2-}$ in HAp]. Die NMR Untersuchungen zeigten jedoch für die hier untersuchten Proben keine Anzeichen für Carbonat.

940-1300 Die Signale bei 969 und 973 cm^{-1} in P-Ser und PS CP_{Lsg} waren $\nu\text{ N-C}$ Schwingungen [144, 138], die bei einer intensiven Wechselwirkung zum Calciumphosphat unterdrückt wurden. Statt dieser beiden deutlichen Signale waren im Spektrum der PS CP_{Lsg} nur noch mehrere kleine Schultern im Anstieg zu dem intensiven Phosphatsignal um $1000 \pm 50\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Die Möglichkeit bei diesen Banden einen schwingenden Dipol auszubilden, war nach der Präzipitation mit Calciumphosphat kaum noch vorhanden.

Das Signal zwischen 1010 und 1200 cm^{-1} setzte sich aus vielen einzelnen Schwingungen zusammen, deren Ursache verschiedene Phosphatschwingungen waren. Detaillierte Analysen der einzelnen möglichen Banden können der Literatur entnommen werden (siehe z.B. *Gadaleta et al.* [78]), aber die generelle Form des Signals zeigte die größte Ähnlichkeit mit publizierten OCP-Spektren [73, 35] und schlecht kristallinem HAp [78, 210]. Bei den aus Lösung ausgefällten Proben waren die einzelnen Signale nicht mehr unterscheidbar. Der Bereich von 1000 - 1150 cm^{-1} war dort zu einem einzigen breiten Signal mit einer kleinen Schulter bei 1125 cm^{-1} verschmolzen. Daraus lässt sich ableiten, dass das Phosphat auf unterschiedliche Weisen mit seinen Gegenionen wechselwirkt und nicht in eine eindeutige Kristallstruktur eingebaut ist. Bei der trockenen Mischung von Phosphoserin mit HAp-Pulver (PS CP_{tr}) war der stark lichtabsorbierende Bereich von 1040 bis 1100 cm^{-1} identisch mit dem Signal des reinen HAp-Pulvers (CP_{tr}).

Die Signale bei 1119 , 1138 und 1163 cm^{-1} in der P-Ser Probe ($\nu\text{ C-O} + \delta\text{ OH} + \nu\text{ N-C} + \rho\text{ NH}_2$, [138]) wurden durch die Beimischung von HAp zu größeren Wellenzahlen nach 1125 , 1156 und 1167 cm^{-1} verschoben. In den simulierten HPO_4^{2-} - Ca^{2+} -Spektren trat mit Zunahme der Gegenionen eine Verschiebung der $\nu\text{ P-O}$ Schwingung auf: $969\text{ (HPO}_4^{2-}) \rightarrow 975\text{ (CaHPO}_4) \rightarrow 1027\text{ cm}^{-1}\text{ ([CaHPO}_4\text{]}_2)$. Die detaillierte Beschreibung dieser Simulation ist ab Abschnitt 3.1.1 zu finden.

Ein sehr prominentes Signal des Phosphoserins war der Doppelpeak bei 1244 und 1256 cm^{-1} . Für Wellenzahlen zwischen 1215 und 1230 cm^{-1} sind bei Aminosäuren $\nu\text{ C-O}$ Schwingungen verantwortlich [226], ein Vergleich mit dem Spektrum des Serins legt jedoch eine $\rho\text{ C-H}_2 + \delta\text{ O-H} + \rho\text{ N-H}_2$ Schwingung nahe [138]. Auch das Signal des simulierten Komplexes PS CP_{sim} zeigt eine $\nu\text{ C-N-H}$ Schwingung bei 1219 cm^{-1} . In der PS CP_{Lsg} Probe reduzierte sich dieses Signal zu einem schwachen, breiten Peak bei 1267 cm^{-1} . Höchstwahrscheinlich werden die gemessenen Signale in erster Linie durch die Aminogruppe verursacht und im langwelligem Bereich des Signals durch eine C-O Schwingung verstärkt. Die deutliche Verringerung der Signalstärke bei der aus Lösung ausgefällten Probe PS CP_{Lsg} zeigt, dass diese Schwingung praktisch verhindert wird und somit eine starke Wechselwirkung mit Gegenionen an.

1300-2000 In den reinen Calciumphosphatproben und in der P-Ser CP_{tr} Probe war in diesem Wellenlängenbereich ein starkes Rauschen vorhanden, das eine detaillierte Interpretation der Probensignale verhindert. Die Spektren der P-Ser und PS CP_{Lsg}-Proben zeigten jedoch eine Reihe interessanter Signale.

Der Doppelpeak bei 1350-1355 cm⁻¹ aus der reinen P-Ser Probe war in der Probe PS CP_{Lsg} praktisch nicht mehr vorhanden. Hier liegt vermutlich eine O-H oder C-O Schwingung vor, die durch die Anwesenheit von Calciumphosphat verhindert oder verschoben wurde [138, 54].

In dem Bereich von 1360 bis 1500 cm⁻¹ schwingen vor allem δ CH₂ und COO Gruppen [138], die durch das Calciumphosphat nur etwas gedämpft und kaum verschoben wurden und somit auch noch in der PS CP_{Lsg} Probe mit kleinen zusätzlichen sub-Peaks vorhanden waren. Auch die Simulation PS CP_{sim} zeigte von 1350 bis 1620 cm⁻¹ in erster Linie C-H und C-O Schwingungen.

Zwischen 1470 und 1410 cm⁻¹ liegen Schwingungen, die durch Carbonat verursacht werden [55, 147]. In allen Proben waren in diesem Bereich nur sehr schwache Signale zu erkennen, woraus geschlossen wurde, dass nur sehr geringe Mengen an Carbonat über die Atmosphäre in die Probe gekommen sind.

Nach *Leberle et al.* schwingen bei Phosphatidylserin fixierte CH₂-Gruppen bei 1467 cm⁻¹, freie Gruppen hingegen bei 1477 cm⁻¹ [144]. Deshalb wurde hier das Signal bei 1464 cm⁻¹ in der Probe mit kristallisiertem Phosphoserin (P-Ser) als Schwingung fixierter CH₂ verstanden und die vielen kleinen Signale im Bereich zwischen 1450 und 1480 cm⁻¹ als teils fixierte und teils frei schwingende CH₂-Gruppen.

Die starke Adsorption bei 1550 cm⁻¹ zeigt nach *Leberle et al.* δ_s NH³⁺ Schwingung an, wenn es eine starke Wechselwirkung zwischen NH⁺...⁻OP gibt. Ist die Aminogruppe nicht mehr in dieser Wechselwirkung gebunden, verringert sich die Wellenzahl zu 1519 cm⁻¹ [144]. Der Phosphoserinkristall weist eine solche Bindung auf [237, 201]. In der aus wässriger Lösung präparierten Probe PS CP_{Lsg} war dieses in kleinere Signale bei 1557, 1541 und 1520 cm⁻¹ fraktioniert. Dies wurde als Hinweis auf unterschiedliche Umgebungen der Aminogruppe interpretiert. Auf Grund der PS CP_{sim} Simulation und den Literaturdaten wurde das starke Signal bei 1554 cm⁻¹, welches in der P-Ser Probe gemessen wurde, einer δ_s NH³⁺ Schwingung zugewiesen.

Das starke Band bei 1620 cm⁻¹ (ν_{s+as} COO [54] und eigene Simulation) in der P-Ser Probe wurde durch die Präsenz von Calciumphosphat zu etwas kürzeren Wellenlängen verschoben, verbreitert und in eine Reihe kleiner Peaks fraktioniert. Die verschiedenen Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Gegenionen und verschiedene Protonierungszustände waren wahrscheinlich hierfür die Ursache.

2000-4000 Der CO₂-Doppelpeak lag wie bei allen Proben erwartet bei 2330 und 2360 cm⁻¹. Die Schwingungen von 2800 bis 2900 cm⁻¹ werden durch ν_{s+as} CH₂ Bewegungen verursacht [266], von 2900 bis 3500 cm⁻¹ dominieren ν NH₂ Schwingungen [138, 226]. Bei der PS CP_{Lsg} Probe waren sie nur noch sehr schwach vorhanden, eine Verschiebung der Frequenzen fand dabei kaum statt.

Die Schwingungen der CP_{tr} Probe bei 2843, 2908 und 2979 cm⁻¹ waren wahrscheinlich O-H assoziiert und konnten in PO-H- CO-H- oder H₂O-Gruppen auftreten. Bei Wellenzahlen größer 3300 cm⁻¹ dominieren O-H Schwingungen, diese verdeckten andere Signale der Proben.

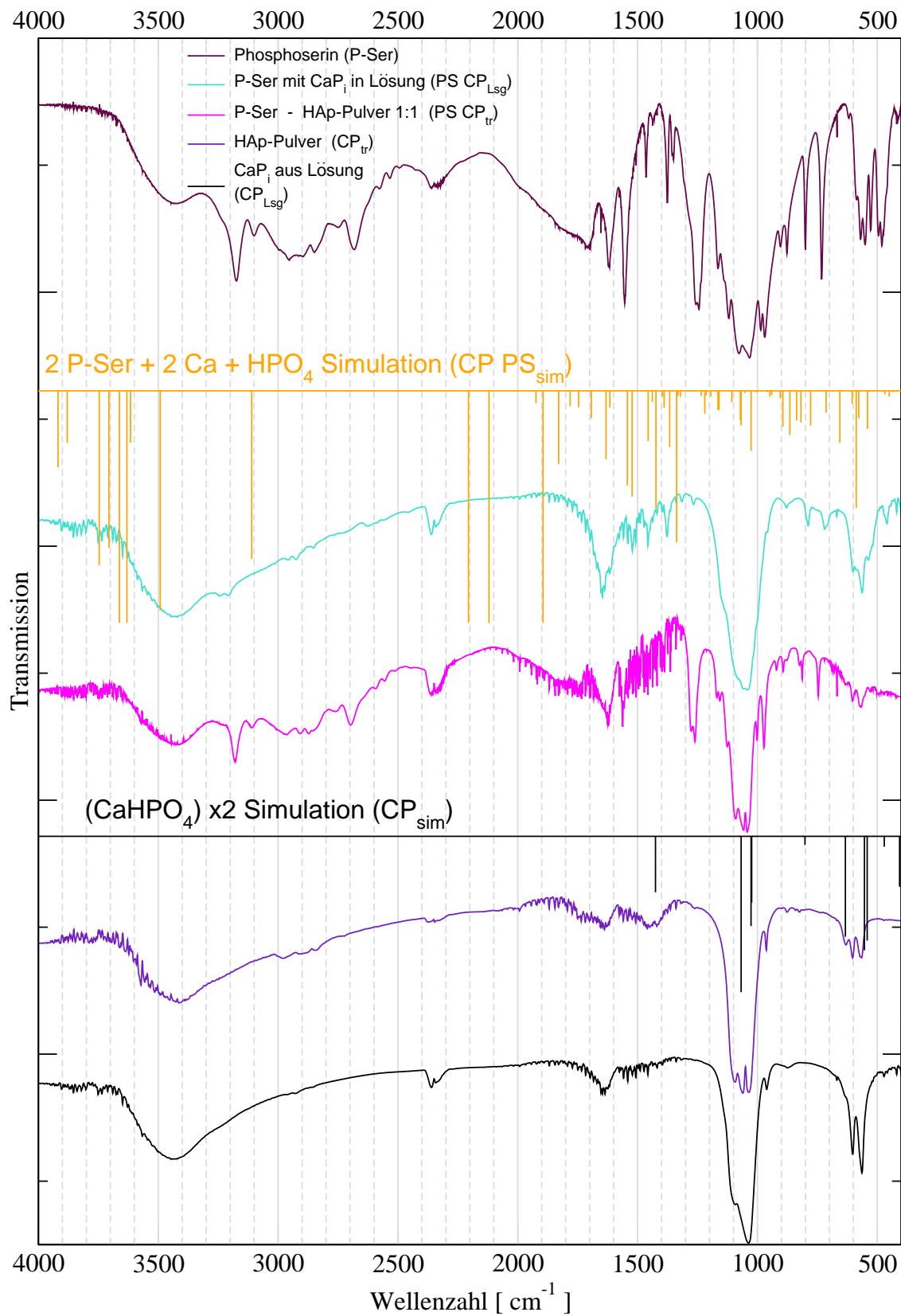
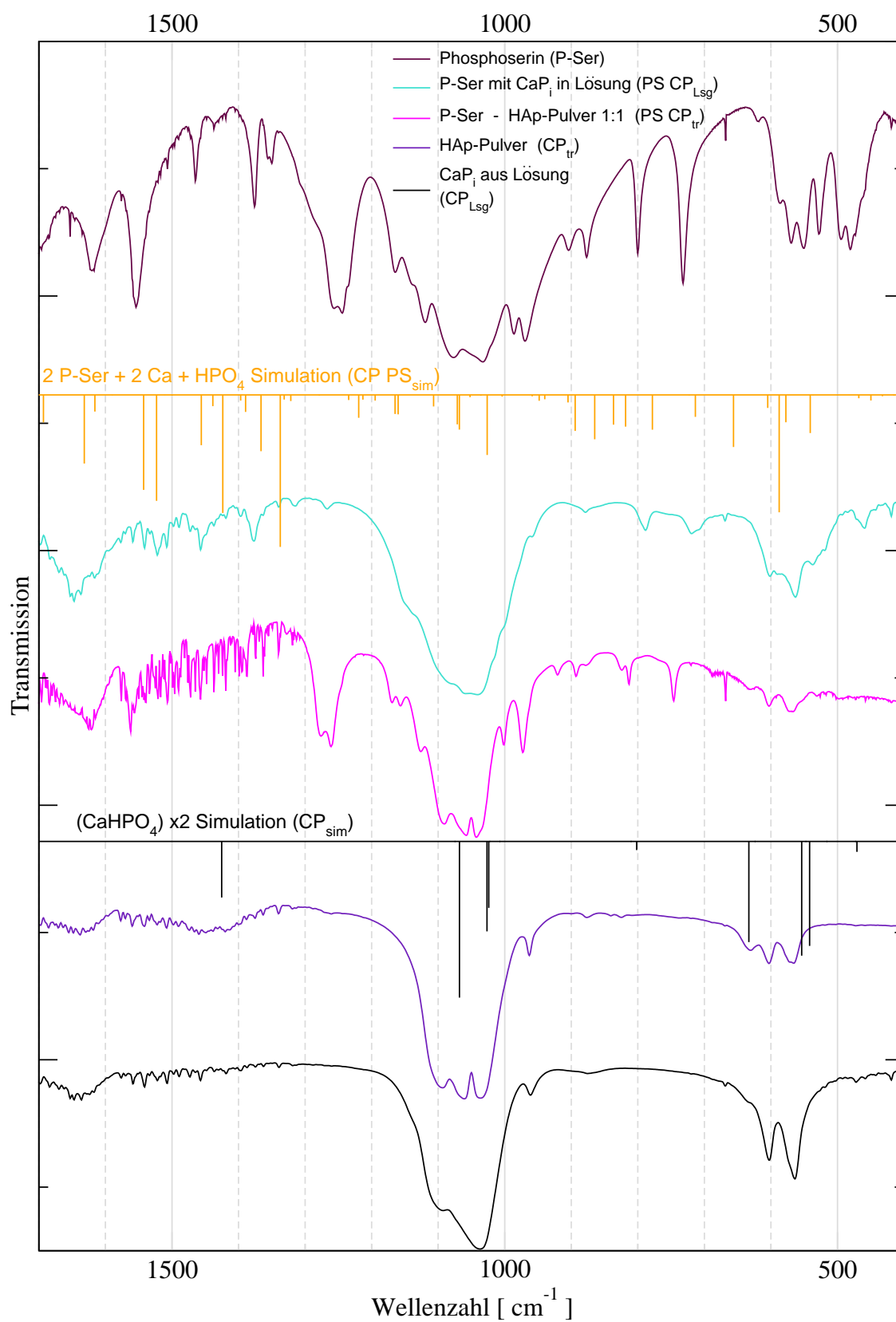


Abbildung 3.16: Calciumphosphat mit und ohne P-Ser im FT-IR ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

Abbildung 3.17: Calciumphosphat mit und ohne P-Ser im FT-IR (400-1700 cm^{-1})

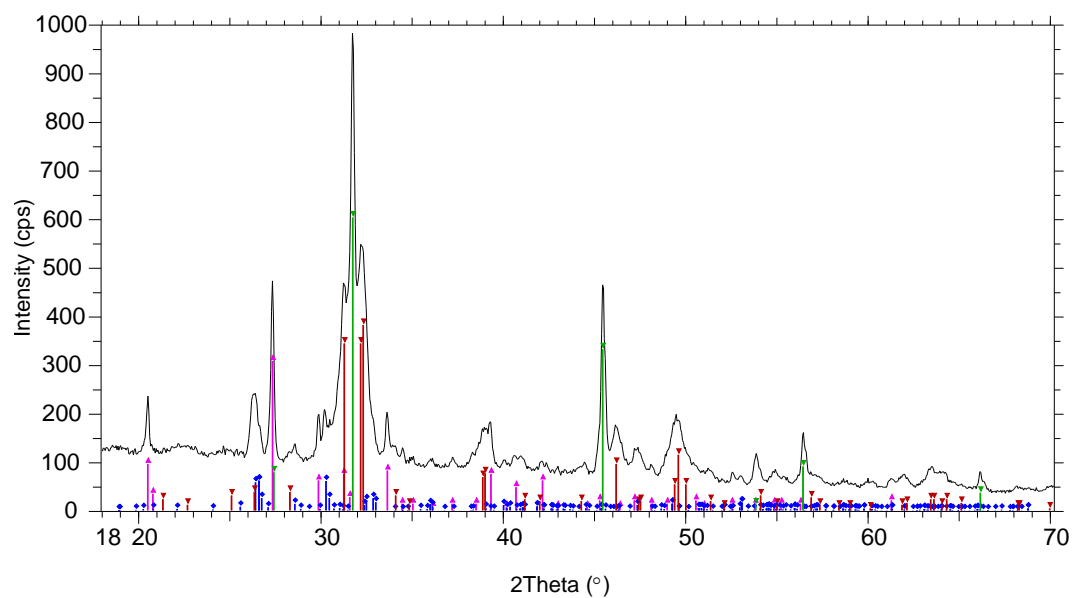
3.2.6 Elementaranalyse, XRD und REM

Elementaranalyse Um das Mengenverhältnis von Phosphoserin zu Calciumphosphat in der PS CP_{Lsg}-Probe zu bestimmen, wurden C, N und H per Elementaranalyse bestimmt. In der CP_{Lsg}-Probe wurden erwartungsgemäß weder Kohlenstoff noch Stickstoff festgestellt. Zusätzlich zur PS CP_{Lsg}-Probe wurden Vergleichsproben mit verschiedenen definierten CaP_i:PS Verhältnissen angefertigt. Als CaP_i wurde bei den Vergleichsproben bei der Elementaranalyse ein HAp-Pulver von Merk und Phosphoserin von Fluka verwendet. Das Verhältnis ist das Gewichtsverhältnis (HAp-Pulver zu PS). Die PS CP_{Lsg} Probe enthielt demnach ca. 29 Gew.% Phosphoserin und 71 Gew.% Calciumphosphat (Daten siehe Tabelle 3.7).

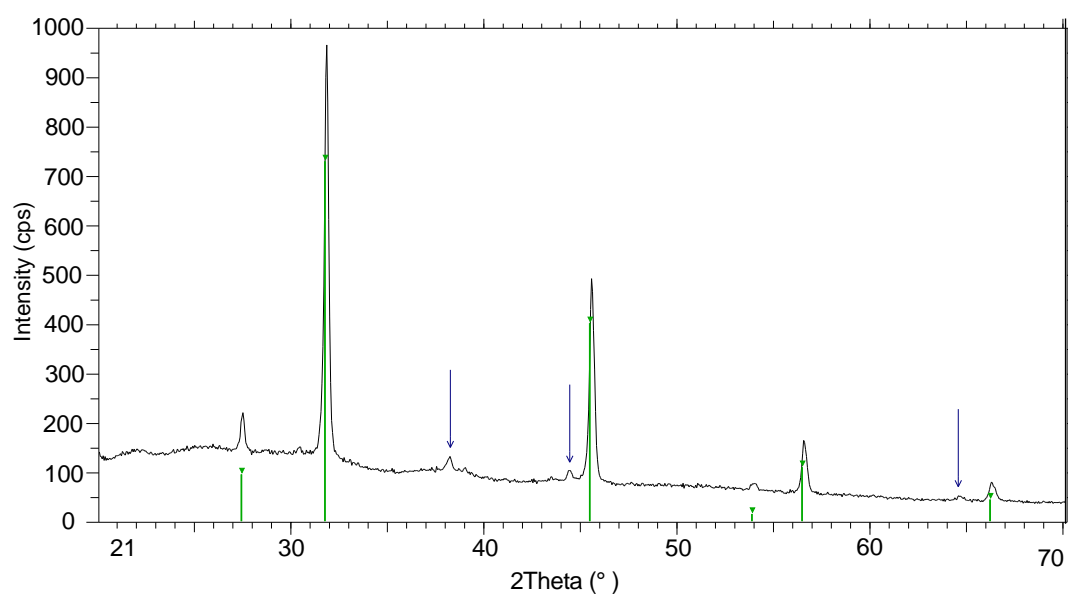
Tabelle 3.7: Die Probe “CP PS_{Lsg}” wurde identisch zu der im NMR gemessenen präpariert (siehe Abschnitt 2.9).

	Probe	N%	C%	H%
1	HAp:P-Ser 1:1	3.78	9.82	1.95
	(Vergleich)	3.78	9.81	1.72
2	HAp:P-Ser 6:1	1.02	2.79	0.49
	(Vergleich)	1.06	2.86	0.48
3	HAp:P-Ser 9:1	0.76	2.11	0.3
	(Vergleich)	0.76	2.1	0.38
4	PS CP _{Lsg}	2.13	7.59	1.39
		2.19	7.48	1.48

XRD Des Weiteren wurden die Kristallphasen mittels XRD untersucht. Um ein Signal zu erhalten müssen mindestens $3 \times 3 \times 5$ HAp Elementarzellen realisiert sein [15]. Während in der phosphoserinhaltigen Probe (PS CP_{Lsg}) nur Halit (kubische NaCl-Phase) nachzuweisen war, wurden in der Probe ohne Phosphoserin (CP_{Lsg}) neben Halit noch drei Kristallphasen ermittelt. Dies sind Calcium Hydrogen Chloride Phosphate Hydrate ($\text{CaClH}_2\text{PO}_4 \times 4 \times \text{H}_2\text{O}$), Monetit (CaHPO_4) und Chlorapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$). Daraus folgt, dass in der phosphoserinhaltigen Probe entweder keine Kristallite vorhanden waren oder deren längste Achse kleiner 5 nm ist.



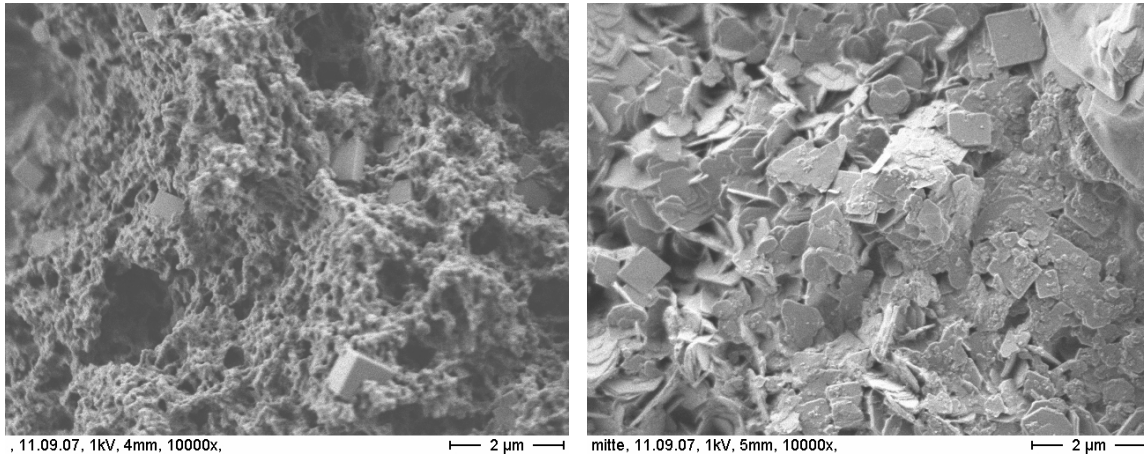
(a) Calciumphosphat ohne Phosphoserin (CP_{Lsg}). Rosa: Calcium Hydrogen Chloride Phosphate Hydrate ($CaClH_2PO_4 \cdot 4H_2O$); Blau: Monetit ($CaHPO_4$); und Rot: Chlorapatit, ($Ca_5(PO_4)_3Cl$)



(b) Calciumphosphat mit Phosphoserin ($PS\ CP_{Lsg}$). Grün: Halit; Pfeile: Aluminium (Probenträger)

Abbildung 3.18: Calciumphosphat mit und ohne Phosphoserin im XRD

REM Von den Proben CP_{Lsg} und $PS\ CP_{Lsg}$ wurden REM-Aufnahmen angefertigt. Die Probe mit Phosphoserin zeigte außer vereinzelt kubischen Formen keine klar erkennbaren Kristallite. Die Probe aus reinem Calciumphosphat hingegen bestand aus dünnen Plättchen von circa einem viertel Mikrometer Fläche (siehe Abbildung 3.19, Präparation siehe Abschnitt 2.9).



(a) Calciumphosphat mit Phosphoserin aus wässriger Lösung ausgefällt, ($PS\ CP_{Lsg}$) (b) Calciumphosphat ohne Zugabe aus wässriger Lösung ausgefällt, Probe CP_{Lsg}

Abbildung 3.19: REM Aufnahmen von Calciumphosphat mit und ohne Phosphoserin aus wässriger Lösung

3.2.7 Zusammenfassung und Interpretation

Phosphoserin ist eine der wichtigsten Aminosäuren, die die Wechselwirkung zwischen Calciumphosphat und Proteinen vermittelt. Die chemisch-physikalische Wechselwirkung dieser Komponenten wurde mit verschiedenen Messgeräten untersucht und wird im Folgenden beschrieben:

Computersimulation Die Bindung des Ca^{2+} an die Phosphatgruppe des Phosphoserins war stabiler als die Bindung des Kations an die Carboxylgruppe. Des Weiteren ermöglicht die räumliche Nähe der $\text{COO}^- - \text{NH}_3^+ - \text{PO}_4^{3-}$ Gruppen höchstwahrscheinlich einen Protonenübertrag zwischen diesen Gruppen. Eine solche protonenableitende Eigenschaft wurde auch von *Dluhy et al.* angenommen [54]. Das starke elektromagnetische Potential, das an der Oberfläche des gesamten Moleküls vorhanden war, macht eine intensive Wechselwirkung mit Ca^{2+} und HPO_4^{2-} sehr wahrscheinlich.

ESI-MS Die unterschiedliche Affinität von Serin und Phosphoserin zu Ca^{2+} und Calciumphosphat wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Dafür wurden Ionenkomplexe mit diesen Aminosäuren in wässriger Lösung, in CaCl_2 - oder Calciumphosphat-Lösung mittels ESI-MS dedektiert. Dabei bildete das Na^+ aus dem Flussmittel etwa genauso häufig Komplexe mit den genannten Aminosäuren wie das in vielen Proben zugegebene Ca^{2+} . Die Signalintensität von Aminosäure-Ionenkomplexen mit zwei Aminosäuren war tendenziell stärker als Komplexe mit einer Aminosäure, so kann angenommen werden, dass bei Entstehung eines Mineralisationskeims das Phosphoserin als Dimer vorliegt. Neben den Komplexen mit Phosphoserin wurde auch ein schwaches Signal eines $\text{Ca}^{2+} \cdots \text{PO}_4^{3-} \cdots \text{Ca}^{2+}$ Komplexes detektiert. Als größter Komplex mit einer Aminosäure und ohne Na^+ wurde ein $\text{PS} \cdots 2 \text{Ca}^{2+} \cdots \text{PO}_4^{3-}$ detektiert, dabei liess mit steigender Größe der Komplexe die Signalintensität schnell nach. Insgesamt traten Ionenkomplexe mit assoziiertem HPO_4^{2-} nur untergeordnet auf. Bemerkenswert ist zudem, dass die Kationen offenbar eher an das Phosphoserin als an ein Phosphation bindeten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass Serin deutlich schwächer an HAp adsorbiert als Phosphoserin [168].

REM / AFM Das Eintrocknen einer reinen Calciumphosphatlösung ohne Aminosäure-Zusatz führte (nach Zugabe kleiner Mengen NaOH) zu nadeligen Kristalliten. Wurde einer solchen Lösung zusätzlich Serin beigemischt, waren bis zu einer Konzentration von 1 mM kaum Veränderungen in der Morphologie der wachsenden Calciumphosphat Kristalle zu beobachten. Die negative Ladung der Carboxylgruppe des Serins reichte offenbar nicht aus, um das Verhalten von Calciumphosphat deutlich zu beeinflussen. Phosphoserin hingegen zeigte schon ab einer Konzentration von 0,01 mM einen deutlichen Einfluss auf die Calciumphosphatpräzipitation. Mit steigender Phosphoserinkonzentration wurden die nadeligen Calciumphosphatkristalle kleiner, bis sie einer amorphen Matrix wichen. Die im AFM sichtbaren, für reines Calciumphosphat typischen Kugeln aus amorphem Calciumphosphat (ACP-Kugeln, ca. 100 nm Durchmesser) wurden durch die steigende Konzentration von Serin kaum beeinflusst, während

bei einer Konzentration von 1 mM Phosphoserin nur noch wenige typische ACP-Kugeln auszumachen waren; stattdessen dominierten etwa zehn mal kleinere Partikel die Aufnahmen. Eine neue, konkrete Morphologie wurde durch Phosphoserin nicht begünstigt. Auch *Reinstorf* hat für die Zugabe von Phosphoserin zu Calciumphosphatzementen einen Rückgang der Kristallitgröße festgestellt [207]. Vermutlich diente Phosphoserin als Nukleationskeim und stabilisierte den sich bildenden Ionenkomplex. Durch die erhöhte Anzahl von Keimen fehlte das Material für das Grössenwachstum und es entstanden viele kleine Partikel.

NMR Zur Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Calciumphosphat und Phosphoserin auf atomarer Ebene wurden NMR-Messungen von ^{15}N - und ^{13}C -markiertem Phosphoserin mit und ohne Calciumphosphat angefertigt, sowie eine Messung einer reinen Calciumphosphatprobe der selben Präparationsmethode vorgenommen. Bei der reinen Phosphoserinprobe war die Carboxylgruppe protoniert, die Phosphatgruppe einfach protoniert und die Aminogruppe dreifach protoniert: $\text{HPO}_4^- - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_3^+) - \text{COOH}$. Nach der Präzipitation mit Calciumphosphat lag der Großteil des Phosphats deprotoniert vor, aber auch Hydrogenphosphat wurde detektiert. Das Proton der Carboxylgruppe war in der Probe des Phosphoserins mit Calciumphosphat (PS CP_{Lsg}) nicht mehr vorhanden. Das ^{15}N -Spektrum zeigte, dass die Aminogruppe mit einer heterogenen Umgebung wechselwirkten. Calciumphosphat und Phosphoserin liessen sich sehr gut mischen, teilweise konnte nicht mehr genau festgestellt werden, ob eine Phosphatgruppe zu der Aminosäure oder zur anorganischen Phase gehörte.

IR Die Wechselwirkung zwischen den funktionellen Gruppen des Phosphoserins und des Calciumphosphats wurde mittels Infrarotspektroskopie untersucht. Hier zeigte sich, dass es bei der trockenen Mischung von Phosphoserin mit HAp-Pulver häufig zu einer Verschiebung von Signalen zu größeren Wellenzahlen kam. Dies stimmte mit den simulierten Spektren und Werten aus der Literatur, die eine Stabilisierung der schwingenden Gruppe durch ein Gegenion als Ursache für diese Frequenzerhöhung annehmen, überein. Das Spektrum der trocken gemischten Probe (PS CP_{tr}) entsprach im Allgemeinen der Summe der Einzelspektren von Phosphoserin und HAp.

Im Gegensatz dazu zeigte das Spektrum, bei dem Calciumphosphat in Gegenwart von Phosphoserin aus wässriger Lösung ausgefällt wurde (PS CP_{Lsg}), eher runde, breite Signale. Unterhalb 1200 cm^{-1} , einem durch Phosphatschwingungen dominierten Bereich, kam es häufig zum Verschmelzen von Signalen. Zwischen 1200 und 2000 cm^{-1} , einem durch N-H und C-H Schwingungen dominierten Bereich, wurden die Signale fraktioniert. Bei Wellenzahlen von 2000 bis 4000 cm^{-1} , verursacht vor allem durch C-H Schwingungen beeinflusste N-H Vibrationen, waren die Positionen der trocken und der aus Lösung gefällten Probe praktisch identisch, die Signalintensität der aus Lösung ausgefallten Probe (PS CP_{Lsg}) war jedoch stark reduziert, was sich durch die geringere Phosphoserinkonzentration erklären lässt.

Je nach Protonierung, Schwingungsmodus und Gegenion zeigten die funktionellen Gruppen leichte Verschiebungen der Schwingungsfrequenz. Diese konnten mit Hilfe der NMR-Untersuchungen und der simulierten IR-Spektren in den meisten Fällen genau erklärt werden.

Tendenziell kam es bei Wellenzahlen unter 600 cm^{-1} mit steigender Protonierung oder steigender Anzahl von Gegenionen zu einer Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen, und bei Schwingungen über 600 cm^{-1} zu einer leichten Verschiebung des Signals zu größeren Wellenzahlen.

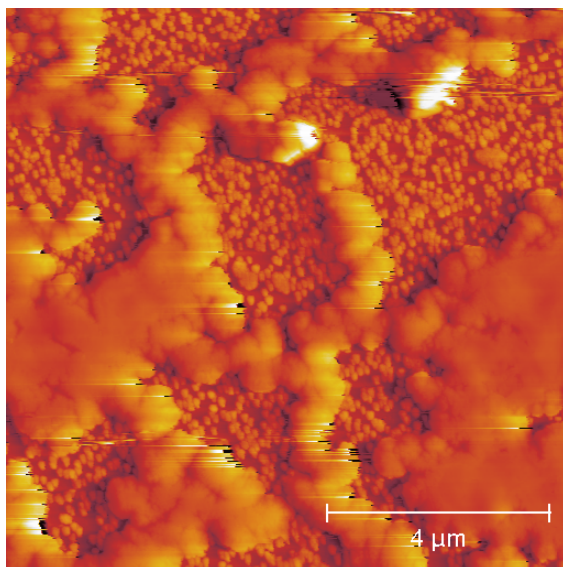
XRD Die XRD Messungen zeigen für die reine Calciumphosphatprobe deutliche Spektren verschiedener Calciumphosphatphasen, während nach der Zugabe von Phosphoserin keine Calciumphosphat Kristallite nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass bei der Fällung aus wässriger Lösung von Calciumphosphat in Anwesenheit von Phosphoserin eine starke Wechselwirkung aller funktioneller Gruppen auftrat und vermutlich die phosphorylierte Aminosäure in die mineralische Phase eingebaut wurde. Die von *Spanos et al.* vorgeschlagene langmuirartige Adsorption von Serin an der Oberfläche eines wachsenden Calciumphosphatkristallits ist somit für Phosphoserin höchstwahrscheinlich nicht gültig [228]. Interessant ist auch der Vergleich mit den Adsorptionsversuchen von *Misra et al.*, bei denen Phosphoserin-Lösung und HAp Pulver gemischt wurde. Während bei verdünnten Lösungen ($< 12,5\text{ mmol/l}$) eine langmuirartige Adsorption stattfindet, wird bei hohen Phosphoserinkonzentrationen ($< 100\text{ mmol/l}$) eine kleine Menge Calciumphosphat herausgelöst und durch das Phosphoserin ersetzt. Das Verhältnis von $\text{Ca}^{2+}:\text{H}_2\text{PO}_4^-:\text{PS}$ beträgt dann 4:4:2 [163]. Dies steht im Einklang mit der Feststellung, dass Phosphoserin mit allen seinen funktionellen Gruppen mit dem Calciumphosphat intensiv wechselwirkt.

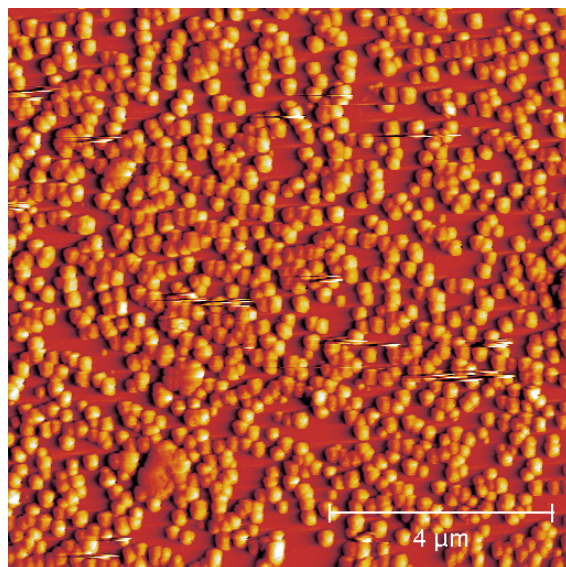
3.3 Fetuin

3.3.1 Fetuin mit Calciumphosphat

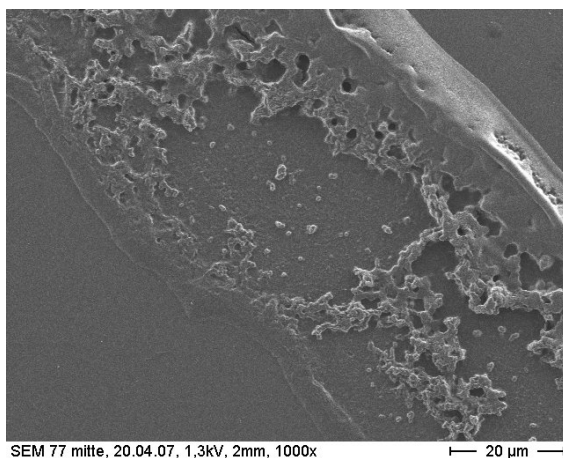
ACP-Stabilisierung Wie in Abschnitt 3.1 angesprochen, führt das einfache Eintrocknen der Calciumphosphat Stammlösung zu Kugeln und einer gleichförmigen Schicht aus Calciumphosphat. Wurde der Lösung Fetuin zugegeben ($0,33 \mu\text{g/ml}$), vergrößerten sich die Kugeln und das gesamte Calciumphosphat war darin gebunden, so dass keine amorphe Schicht mehr vorhanden war. Die Fetuin-ACP-Kugeln hatten eine Größe von etwa 60 nm im Durchmesser und zeigten eine Unterstruktur aus kleineren Kugeln, ähnlich der ACP-Kugeln ohne Fetuin (in Abschnitt 3.1.2 beschrieben). Offenbar stabilisierte Fetuin die ACP-Kugeln und verhinderte deren Verschmelzung. Die REM-Abbildungen zeigen den Rand eines eingetrockneten Tropfens Calciumphosphat Stammlösung (siehe Abbildung 3.20, Präparation siehe 2.8.3).



(a) Calciumphosphat

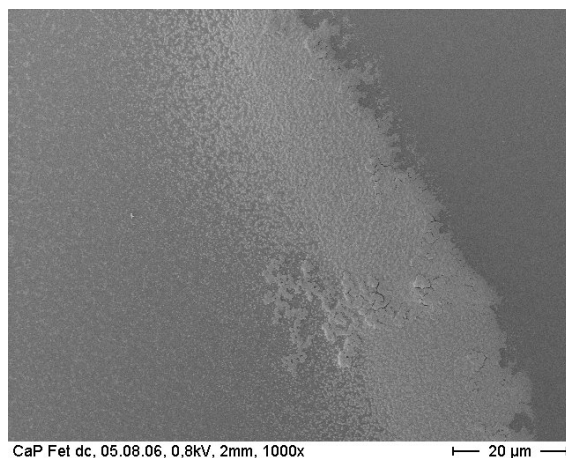


(b) Calciumphosphat mit Fetuin



SEM 77 mitte, 20.04.07, 1,3kV, 2mm, 1000x

(c) Calciumphosphat

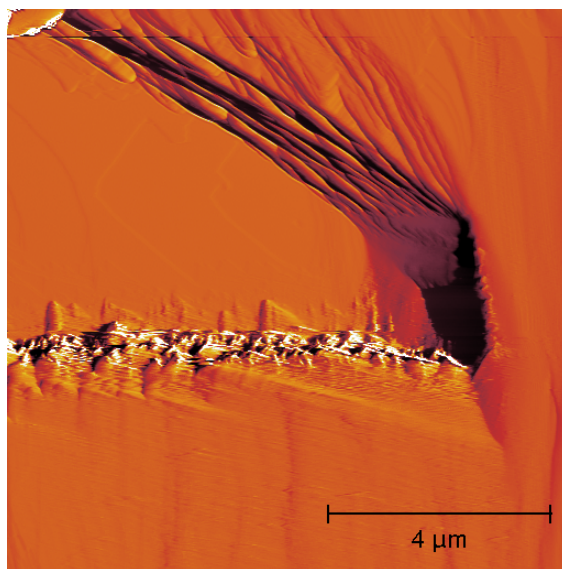


CaP Fet dc, 05.08.06, 0,8kV, 2mm, 1000x

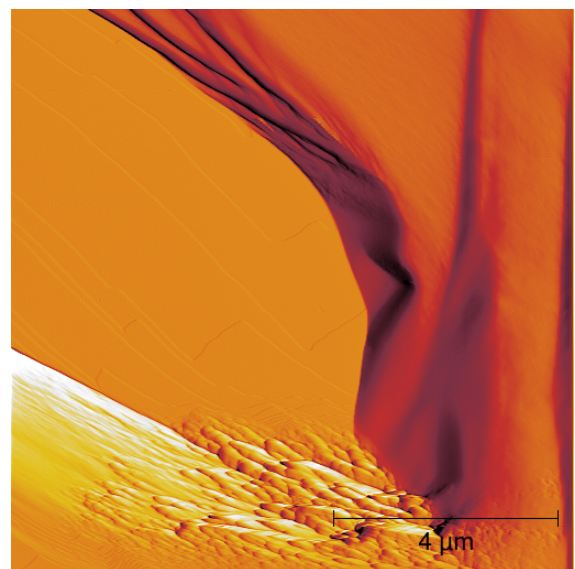
(d) Calciumphosphat mit Fetuin

Abbildung 3.20: Calciumphosphat ohne ((a), (c)) und mit ((b), (d)) Fetuin.

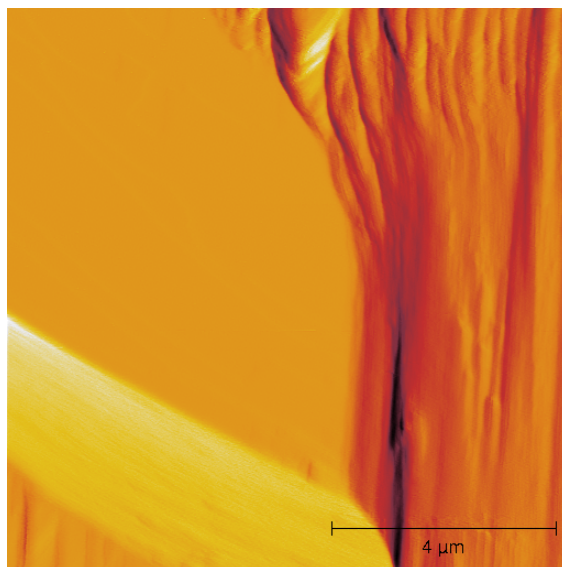
Fetuin auf Brushit Die Abbildungen 3.21(a) und 3.21(b) zeigen das Auflösen von Brushit nach der Zugabe von Wasser im AFM. Während sich die obere Kante der Mulde praktisch nicht veränderte, wurde die untere Kante so lange aufgelöst, bis sie nahezu parallel zu der oberen war. Nach 2 h 30 min wurde das Wasser gegen eine Fetuinlösung ausgetauscht (Abbildungen 3.21(c) und 3.21(d)). Die Kristalloberfläche zeigte darauf hin keine deutlichen Veränderungen. Form und Größe der Mulde waren auch nach weiteren 2 h 12 min unbeeinflusst. In weiteren, ähnlichen Versuchsreihen mit TRIS und TRIS mit Fetuin (siehe Anhang, Abbildung 3.24) waren die Auflösungserscheinungen etwas deutlicher. Ein Wiederausfällen von Calciumphosphat wurde



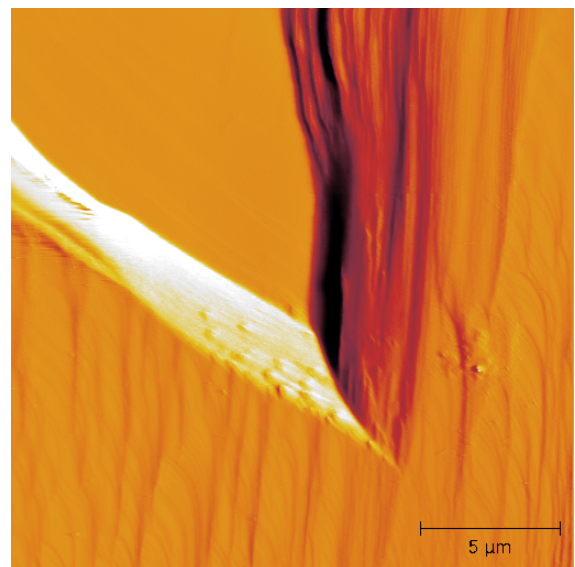
(a) 3 min nach Zugabe von Wasser



(b) 2 h 15 min nach Zugabe von Wasser



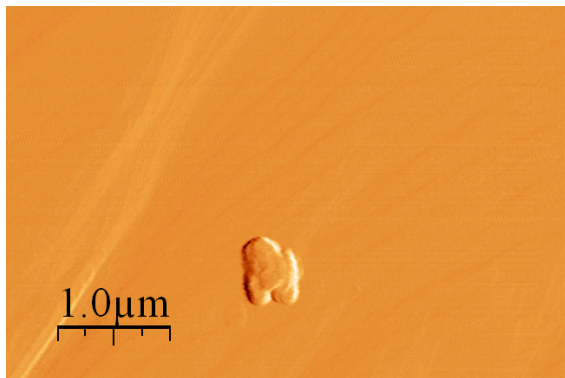
(c) 5 min nach Zugabe von Fetuinlösung



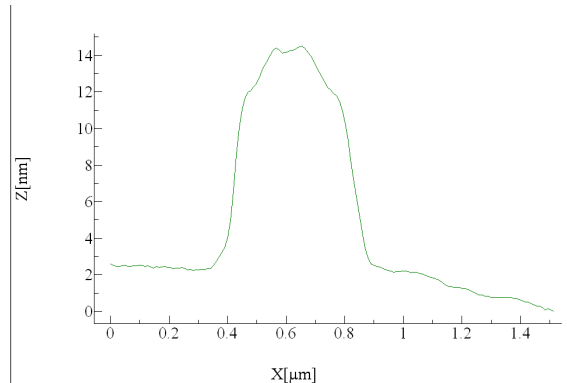
(d) 2 h 12 min nach Zugabe von Fetuinlösung

Abbildung 3.21: Brushit in Wasser bzw. Fetuinlösung. (a) 3 min nach Zugabe von 70 μl Wasser; (b) 2 h 15 min nach Zugabe von Wasser; (c) 3 min nach Zugabe von Fetuinlösung (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$); (d) 2 h 12 min nach Zugabe von Fetuinlösung;

nur in einem Versuch beobachtet. Bei diesem Versuch wurde das Fetuin in Calciumphosphat Stammlösung aufgenommen und auf einen Brushitkristall gegeben. Nach kurzer Zeit traten Partikel in der Größenordnung von ca. $400 \text{ nm} \times 12 \text{ nm}$ auf, die sich im Laufe von zwei Stunden zu einer Ansammlung von Plättchen wandelten (siehe Abbildung 3.22, Präparation siehe Abschnitt 2.8.3).



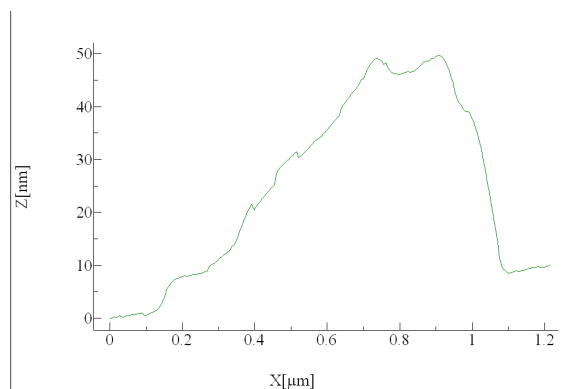
(a) Calciumphosphat-Fetuin Partikel, 5 min nach Zugabe der Calciumphosphat-Fetuinlösung



(b) Profil des Partikels (unterschiedliche Skalierung der x und y Achse)



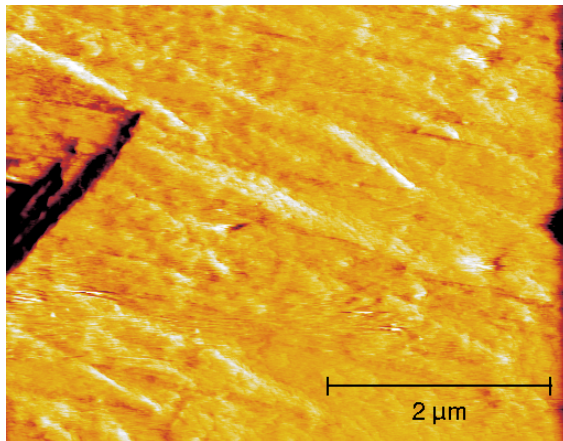
(c) Calciumphosphat-Fetuin Partikel, 2h nach Zugabe der Calciumphosphat-Fetuinlösung



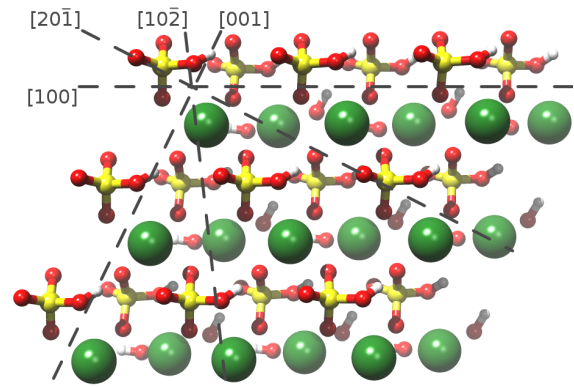
(d) Profil des Partikels (unterschiedliche Skalierung der x und y Achse)

Abbildung 3.22: Ein Calciumphosphat-Fetuin Partikelniederschlag entsteht, wenn Fetuin in gesättigter Calciumphosphatlösung auf Brushit gegeben wird

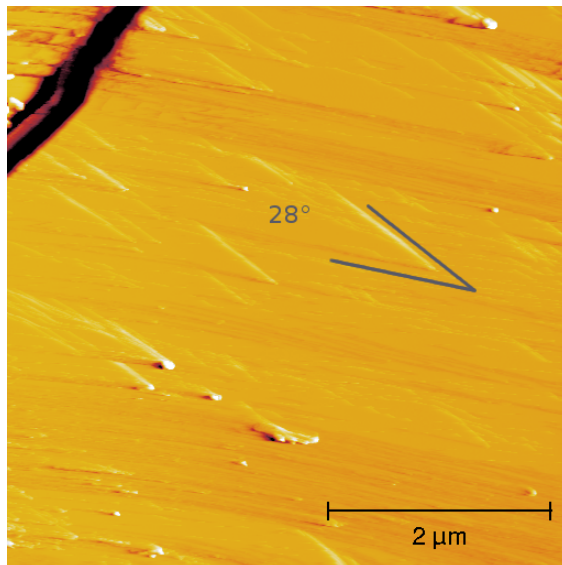
Brushit in Lösung In der Bildgruppe 3.23 ist die $[010]$ -Oberfläche eines Brushitkristalls zu sehen. Während die Abbildung (a) einen Kristall zeigt, der trocken in Raumklima abgebildet wurde, ist auf der Abbildung (c) die selbe Oberfläche in TRIS Puffer zu sehen. Der unbehandelte Kristall wies eine raue Oberfläche auf, wohingegen der benetzte Kristall eine wesentlich glattere Oberfläche und Winkel von 28° zeigte. Nach zwei Stunden zeigte der Kristall deutliche Lösungserscheinungen (Abbildung (d)), und der gleiche Winkel dominierte das Erscheinungsbild. Die in Abbildung 3.23 (d) sichtbaren Stufen haben eine Höhe von 7 \AA , was der Höhe der Elementarzelle des Brushits entspricht. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich auf der Oberfläche des trockenen Kristalls eine Schicht aus $\text{ACP} + \text{H}_2\text{O}$ gebildet hat, die durch den TRIS Puffer aufgelöst wurde. Eine amorphe Schicht um HAp-Nanokristallite wurde auch



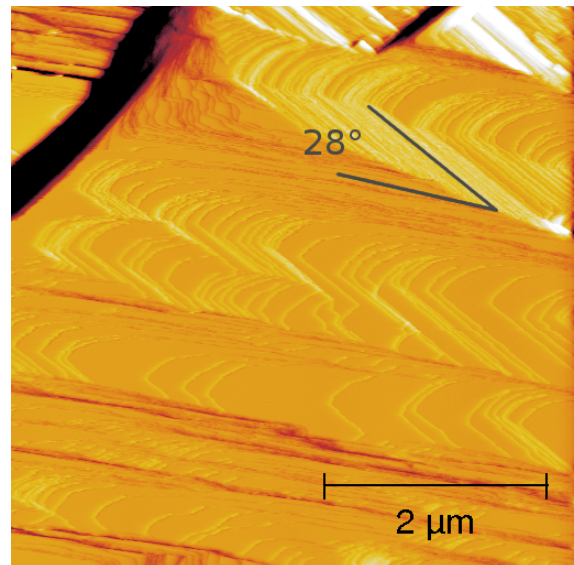
(a) Brushit [010]-Fläche trocken



(b) [010]-Fläche des Brushitgitters im Modell.



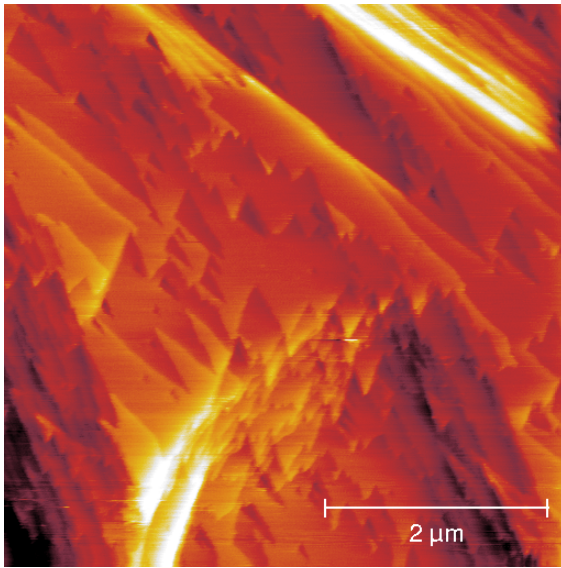
(c) Brushit in TRIS nach ca. 5 min Inkubationszeit



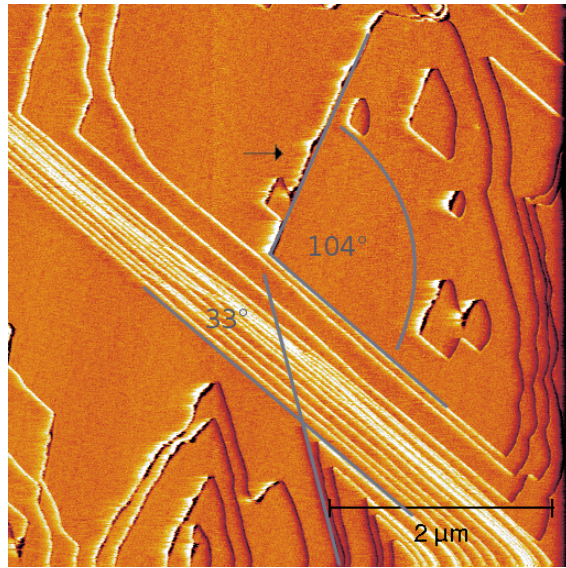
(d) Brushit im AFM nach 2 h in TRIS-Puffer

Abbildung 3.23: Brushit im AFM, trocken (a) und 5 min nachdem dieser mit TRIS-Lösung benetzt wurde (c). Nach 120 min in TRIS-Puffer sind deutliche Auflösungserscheinungen sichtbar. In Abbildung (b) ist die [010]-Fläche des Brushits im Modell zu sehen.

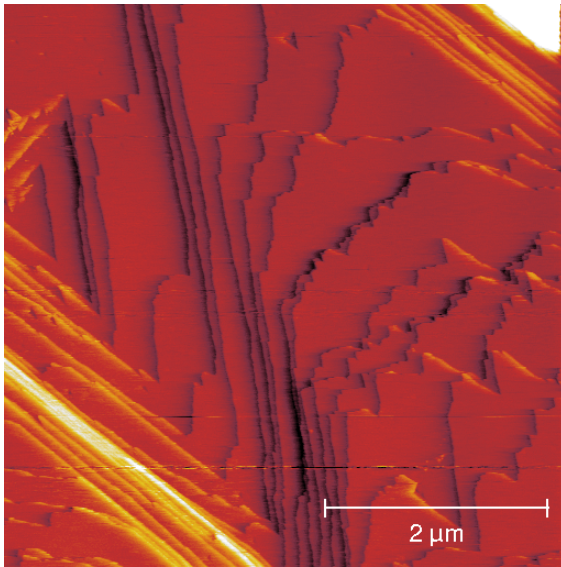
mittels NMR nachgewiesen [118]. Die dreieckige Form der Lösungsbereiche stimmt mit anderen Publikationen überein [185, 184]. Die typischen Winkel eines Brushits liegen zwischen 27° und 33° und sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst [148]. Der Winkel liess sich aus den AFM Abbildungen auf etwa 1° genau messen, deshalb konnte ein bestimmter Winkel nicht mit Sicherheit zugewiesen werden; allerdings lag der $27^\circ 45'$ ($= 27,75^\circ$) den gemessenen 28° am nächsten und wurde hier diesem zugeordnet. Damit sind die Kanten der [100] und $[20\bar{1}]$ Fläche zu sehen. Die obere Kante erscheint in Abbildung 3.23(d) glatter und wurde der Kante der [100] Fläche zugeordnet.



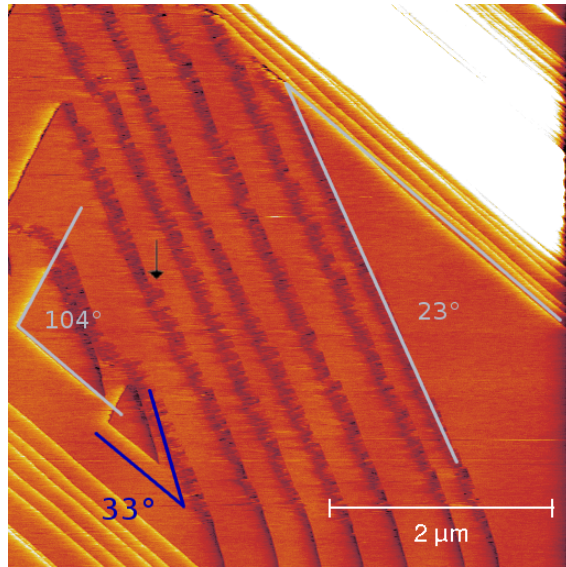
(a) Brushit in TRIS nach 0 min



(b) Brushit in TRIS nach 120 min



(c) Brushit in TRIS mit Fetuin nach 0 min



(d) Brushit in TRIS mit Fetuin nach 120 min

Abbildung 3.24: Brushit im AFM in einer Flüssigzelle unter dem Einfluss von TRIS mit ((a) + (b)) und ohne ((c) + (d)) Fetuin.

Weitere typische Winkel, die nach dem Lösen in TRIS auftraten waren 104° und 33° (Abb. 3.24(b)). Die den 33° Winkel einschließenden Kristallflächen sind wahrscheinlich die $[001]$ und $[101]$ Fläche (siehe Tabelle 4.4, [148]). Im Gegensatz dazu zeigte sich in fetuin-haltigen TRIS-Puffer ein Winkel von 23° der keinem, der häufig auftretenden durch die Hauptkristallflächen einschliessendem Winkel zugewiesen werden konnte. An einer Kante des Winkels sind deutliche Schlieren zu erkennen, die von der horizontalen Abrasterung des AFM herrührten, und auf eine instabile Struktur an dieser Stelle hinweisen (Abb. 3.24(d), Pfeil). Des Weiteren sind Stufen entlang der Kante zu sehen, so dass eine Kombination zweier sich oft abwechselnder Flächen angenommen wird (siehe Pfeil, Abb. 3.24(d)). Die Anwesenheit

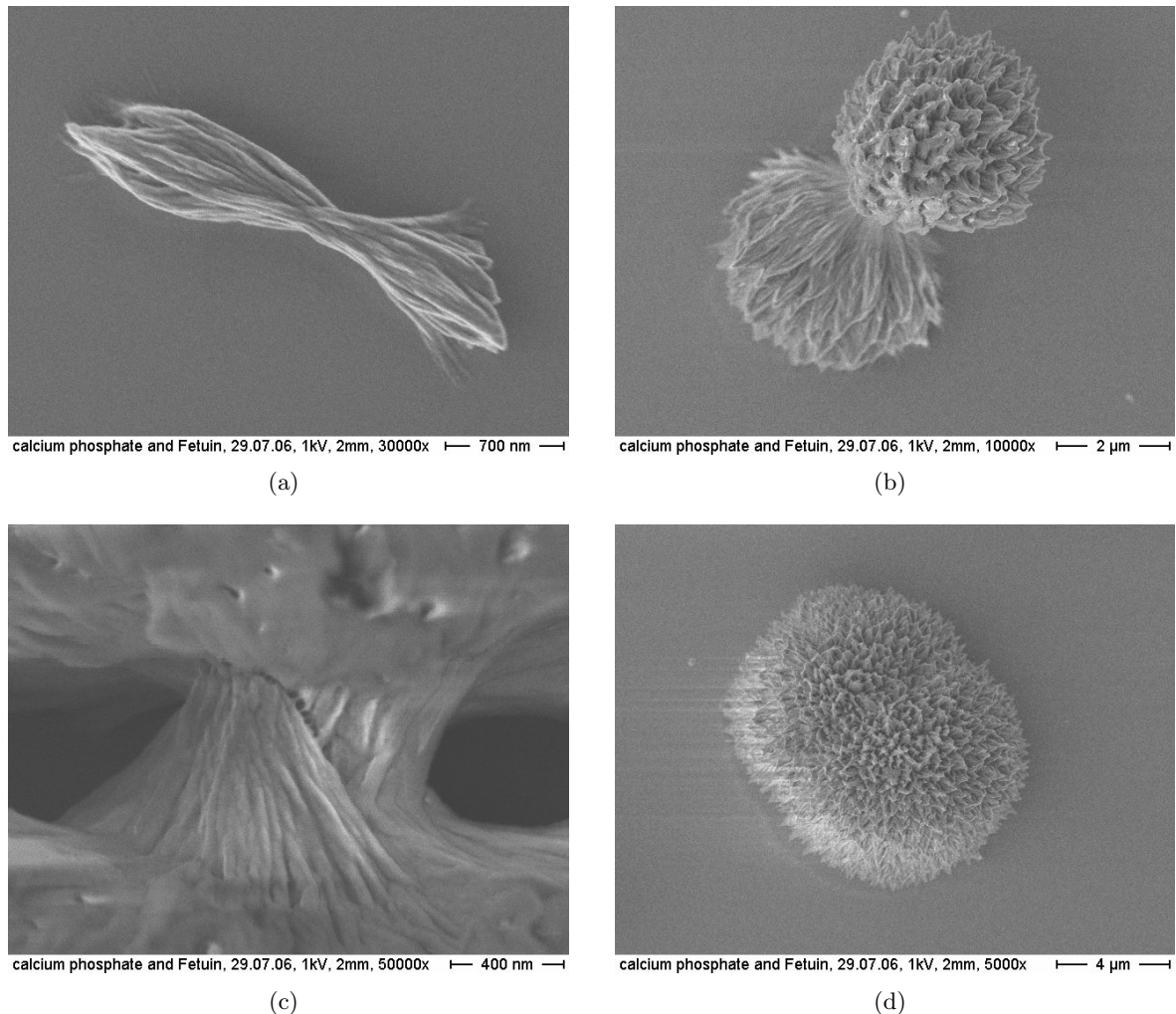


Abbildung 3.25: Calciumphosphat kann zusammen mit Fetuin Hanteln bilden. Die Abbildungen zeigen Objekte einer Präparation, vermutlich handelt es sich um verschiedene Stadien während des Hantelwachstums.

von Fetuin destabilisierte anscheinend die mit dem Pfeil markierte Kante. Auch die 104° in den Abbildungen 3.24(b) und 3.24(d) kann nicht aus der Kombination der sich schneidenden Flächen der Hauptkristallrichtungen und deren Winkelhalbierenden erklärt werden. Eine permanente Fetuinadsorption oder Repräzipitation wurde nicht beobachtet.

Calciumphosphat-Hanteln durch Fetuin Das Mischen einer verdünnten Ca^{2+} -Lösung mit einer verdünnten phosphathaltigen Fetuinlösung (siehe Präparation „Hanteln“, Seite 33) führte in Gegenwart von Fetuin zur Entstehung von hantelförmigen Strukturen. Dabei wuchsen stäbchenförmige Kristallite aus der Mitte nahezu parallel nach außen. Die Enden der Stäbe waren nicht flach, sondern liefen spitz zu. Durch einen kleinen Winkel zwischen den Stäbchen kam es zu einer Auffächerung an deren Enden, während sie an ihrem Scheitelpunkt teilweise blumenstraußartig aneinandergelagert waren. Bei einer ausreichend großen Anzahl von Stäbchen entstand eine geschlossene Kugel von 4-8 μm Durchmesser (siehe Abbildung 3.25).

Einzelne Stäbe wurden nicht gefunden. Mit bloßem Auge war in der Lösung keine Trübung zu erkennen.

3.3.2 Fetuin mit Kollagen

Der Einfluß von Fetuin auf die Kollagenassemblierung wurde untersucht, indem den Kollagenmonomeren vor ihrer Assemblierung 0, 1, 10, 50 oder 100 μg Fetuin pro mg Kollagen zugegeben wurde. Der Fortschritt der Assemblierung wurde durch die Lichtabsorption bei 313 nm im UV/vis-Spektrometer verfolgt. Diese stieg mit fortschreitender Assemblierung der Monomere und gab so die Reaktionsgeschwindigkeit wieder (Präparation siehe 2.4.2). Das Diagramm in Abbildung 3.26 zeigt die Assemblierungsgeschwindigkeit bei den verschiedenen Fetuinkonzentrationen und ohne Fetuin. Alle Graphen liegen sehr dicht zusammen, dies bedeutet, daß Fetuin praktisch keinen Effekt auf die Assemblierungsgeschwindigkeit von Kollagen hatte. Des Weiteren wurden diese mit Fetuin assemblierten Proben im AFM

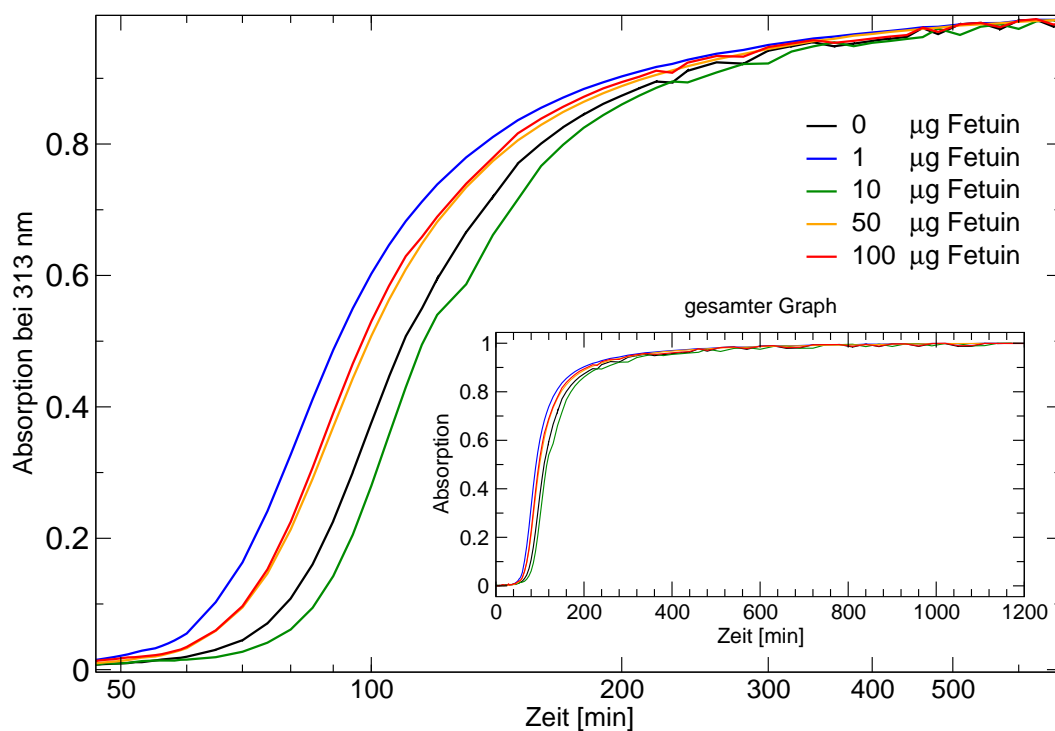


Abbildung 3.26: Kollagenassemblierung in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen Fetuin. Darstellung in der Zeitdomäne, UV/vis bei 313 nm. Die verschiedenen Fetuinkonzentrationen zeigen fast keinen Einfluss auf die Assemblierungsgeschwindigkeit. Alle Graphen sind normiert und normalisiert.

untersucht, um den Einfluss auf die Morphologie der Fibrillen abschätzen zu können. Die auf den Abbildungen 3.27 sichtbaren Unterschiede waren nicht größer als die innerhalb einer Kollagenprobe. Daraus kann geschlossen werden, dass Fetuin nicht oder nur sehr wenig mit Kollagen wechselwirkt. Auch wenn die Assemblierung von Fibrillen mit Calciumphosphat erfolgte, war im REM kein deutlicher Unterschied zwischen der Assemblierung mit und ohne Fetuin zu sehen (siehe Abbildung 4).

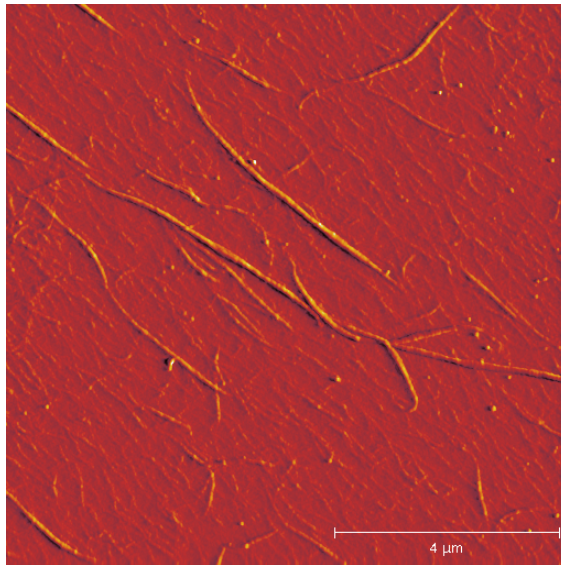
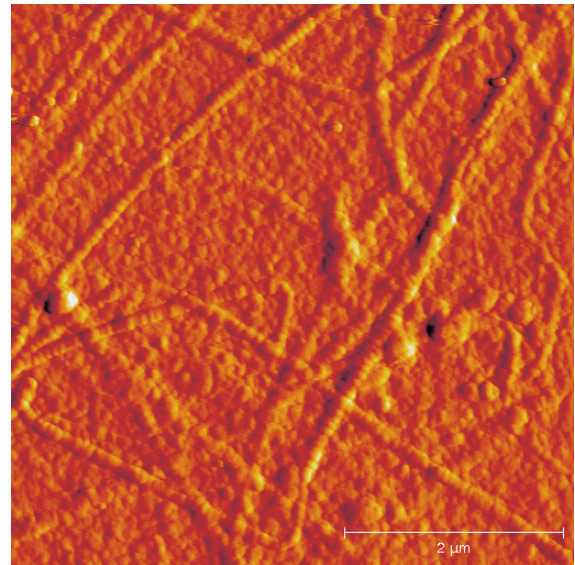
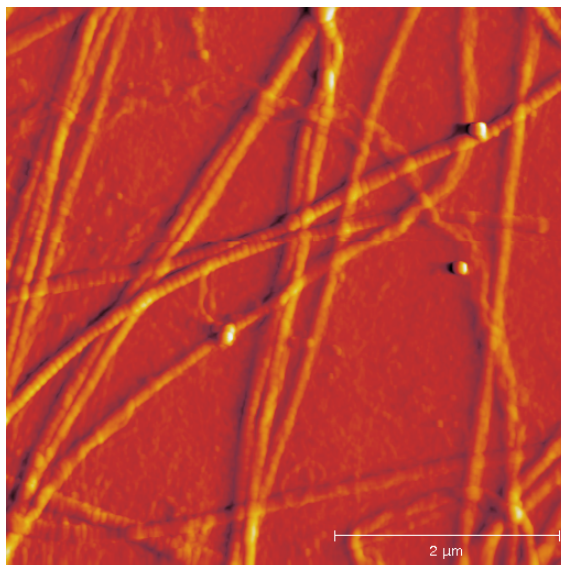
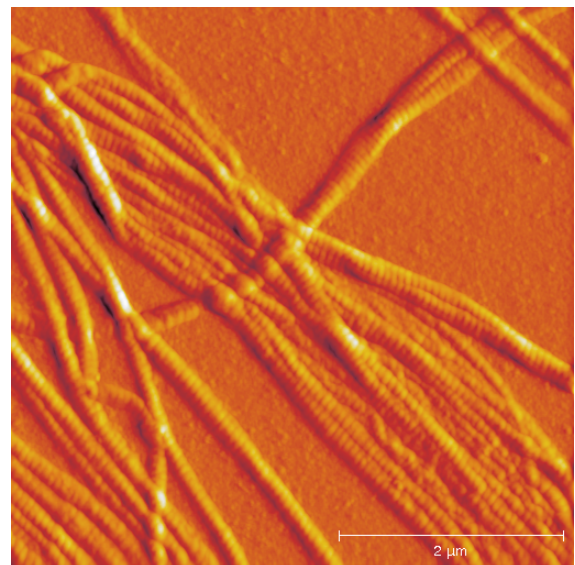
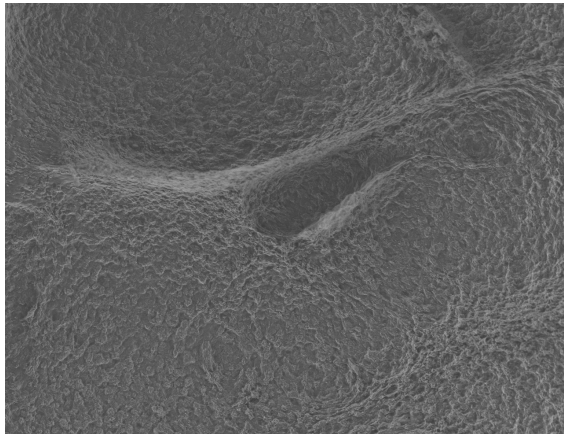
(a) 0 μg Fetuin(b) 1 μg Fetuin(c) 10 μg Fetuin(d) 100 μg Fetuin

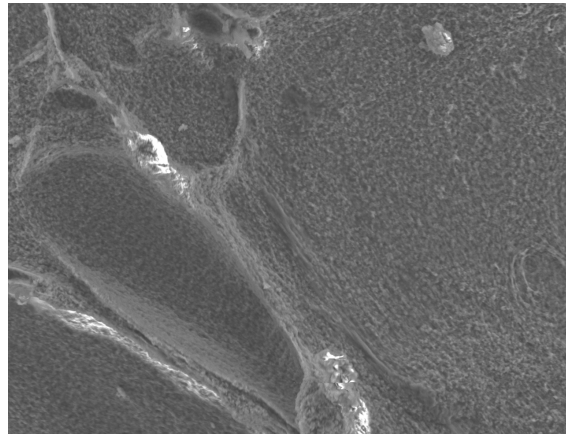
Abbildung 3.27: Mineralisation von Kollagen in Anwesenheit von verschiedenen Mengen Fetuin: (a) ohne Fetuin; (b) mit 1 μg Fetuin; (c) mit 10 μg Fetuin; und (d) 100 μg Fetuin. Die AFM-Abbildungen zeigen die Proben aus den UV/vis Mesungen (Diagramm 3.26). Die Kollagenfibrillen zeigen keine morphologischen Besonderheiten.

3.3. Fetuin

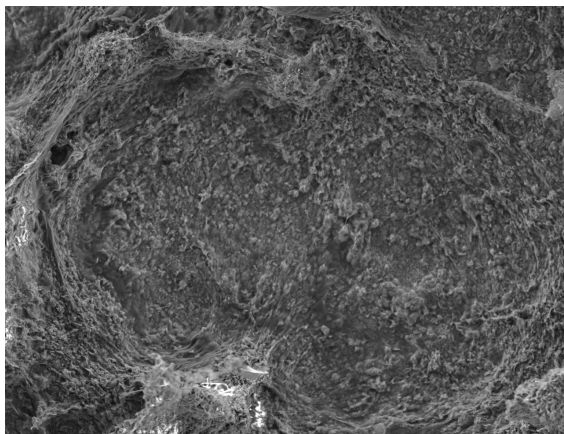
Tapes Des Weiteren wurden in der Arbeitsgruppe etablierte, membranartige Knochenersatzmaterialien aus Kollagen und Calciumphosphat, genannt Tapes, mit verschiedenen Mengen Fetuin hergestellt [81]. Makroskopisch zeigten diese keinen Unterschied zu den Tapes ohne Fetuin. Die REM-Abbildungen (3.28) zeigten jedoch eine mit steigendem Fetuingehalt ungleichmäßigere Struktur der Oberfläche. Im Anhang sind REM-Aufnahmen der Unterseite des Tapes 3.28 zu finden (Präparation siehe 2.8.3, Seite 37).



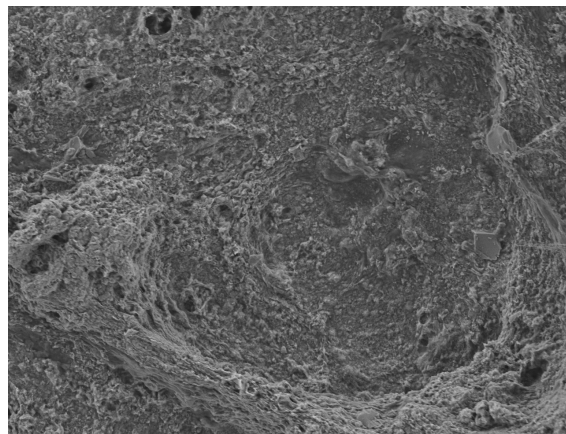
(a) 1 µg Fetuin



(b) 10 µg Fetuin



(c) 50 µg Fetuin



(d) 100 µg Fetuin

Abbildung 3.28: Tapes, rauhe Seite mit verschiedenen Mengen Fetuin pro 1 mg Tape: (a) 1 µg Fetuin; (b) 10 µg Fetuin; (c) 50 µg Fetuin; und (d) 100 µg Fetuin. Es handelt sich um die selben Tapes wie in Abbildung 4.

3.3.3 Zusammenfassung und Interpretation

Das wichtigste, bislang bekannte Protein zu Prävention ektopischer Mineralisierung bei Säugetieren ist Fetuin. Die in dieser Arbeit mit dem AFM und REM dokumentierten *in vitro*-Beobachtungen von Fetuin in gesättigter und übersättigter Calciumphosphat-Lösung erlauben wertvolle Rückschlüsse auf dessen Wirkungsweise.

Fetuin verhinderte das Verschmelzen von Kugeln aus amorphem Calciumphosphat (ACP) zu einer homogenen Masse. Selbst der direkte Kontakt zweier ACP-Kugeln führte in Gegenwart von Fetuin nicht zum Verschmelzen. Das ζ -Potential (Zeta-Potential) der ACP-Fetuinkugeln wurde auf -9 mV bestimmt, so dass sich wahrscheinlich die an der Oberfläche negativ geladenen Kugeln abstoßen [97]. Dies spricht für den von *Heiss et al.* vorgeschlagenen Aufbau der Kugeln, die eine Fetuinhülle um das ACP vermuten [98]. Die Größe der Kugeln mit 60 nm \varnothing entsprach der ersten von zwei vorgeschlagenen Stufen in der Reifung von ACP-Fetuin-Kugeln. Da nur wenige Minuten vergehen, bis der Calciumphosphat-Fetuin Tropfen eingetrocknet ist, wurde die zweite Stufe der Entwicklung der ACP-Kugeln nicht erreicht. Diese tritt erst nach mehreren Stunden auf und ist durch ein Anwachsen des Durchmessers auf 90-125 nm gekennzeichnet [97]. Die 5 nm große Unterstruktur der ACP-Kugeln (siehe Abb. 3.4) war sowohl mit als auch ohne Fetuin vorhanden. Das Protein greift vermutlich nicht aktiv in den Mineralisierungsprozess ein, bevor die ACP-Kugeln einen Durchmesser von ca. 50 nm erreicht haben. Dies könnte daran liegen, dass die spezifische Oberfläche der Unterstruktur so groß ist, dass die getesteten, biologisch relevanten Fetuinkonzentrationen nicht ausreichen, um die Entwicklung von der Unterstruktur zu den Partikeln der ersten Stufe zu beeinflussen.

Der geringe Einfluss des Fetuins auf die Assemblierung des Kollagens mit und ohne Calciumphosphat sowie der geringe Einfluß auf das Lösen von Brushit legen nahe, dass Fetuin bei der Modellierung der mineralischen Phase des Knochens keine dominante Rolle spielt. Da Fetuin allerdings die Zellkommunikation von Osteoblasten beeinflusst [18], könnte es sich dennoch als ein wirkungsvoller Zusatz in einem Knochenersatzmaterial herausstellen. Die Herstellung solcher Materialien erfolgte problemlos. Bei den Versuchen, von Brushit im AFM mittels Fetuinlösung aufzulösen, waren auch nach mehreren Stunden keine ACP-Fetuinkugeln sichtbar. Vermutlich waren diese zu leicht, um sich innerhalb weniger Stunden abzulagern. Erst eine starke Übersättigung führte zur Repräzipitation, wobei das erste entdeckte Objekt schon einen Durchmesser von fast 500 nm hatte und somit größer als eine ACP-Kugel war. Möglicherweise findet mit dem Partikelwachstum über die zweite Phase hinaus eine Erhöhung der Dichte in den Calciumphosphatkugeln statt.

Die mit Fetuin und Calciumphosphat hergestellten Hanteln unterschieden sich in zwei Punkten von den von *Knies und Busch* publizierten, ebenfalls hantelähnlichen Strukturen, die in Gelatine gezüchtet wurden [39, 40]. Während in dieser Arbeit die Enden der Calciumphosphatstäbchen spitz zuliefen, sind bei *Busch et al.* die Enden durch eine Fläche begrenzt, die teilweise von den bei Apatit üblichen Winkeln begrenzt wird. Des weiteren wird in dieser Arbeit der Mittelpunkt durch aneinander gelagerte Stäbchen gebildet (siehe Abb. 3.25), die nur teilweise verschmolzen sind, während bei *Busch et al.* ein einzelner Kristallit als Keim

dient.

Deutlich ähnlicher zu den hier vorgestellten Strukturen sind die von *Prymak et al.* und *Schwarz und Eppele* vorgestellten Hanteln, die in Gegenwart von Titan- oder Polymerplättchen oder in einem schlauchförmigen Reaktor ohne Zusätze, aber in deutlich übersättigter Calciumphosphatlösung gezüchtet wurden [200, 219]. In deren Versuchen zeigen die Calciumphosphatstäbchen meist spitze Enden, wodurch die Hanteln und Kugeln stachlig wirken. Nur im schlauchförmigen Reaktor wurden die Enden flach und die Hanteln sehen den von *Busch et al.* sehr ähnlich. Allerdings verschmelzen deren Stäbchen in der Mitte zu einem einzigen Keim. Des weiteren konnten *Schwarz und Eppele* zeigen, dass der pH-Wert und die Konzentration der hantelbildenden Salze entscheidend für die Form und das Erscheinungsbild der Hanteln sind, während zusätzliche Salze keinen deutlichen Einfluss haben.

Die von *Yu et al.* publizierten Hanteln bestehen aus Bariumcarbonat und wuchsen unter dem Einfluss eines Blockpolymers². Ohne dieses Polymer entstanden feinere, dendritische Strukturen [270].

Die von *Heiss et al.* publizierten Abbildungen zeigen ACP-Kugeln, die sich in Anwesenheit von Fetuin in einzelne Stäbchen umwandeln, die auch bündel- oder sternförmig gruppiert sein können [97, 98, 96]. Hanteln sind allerdings auf den gegebenen TEM-Abbildungen von *Heiss et al.* nicht zu erkennen. Es ist dennoch anzunehmen, dass sich das in der Lösung befindliche Fetuin an den Stäbchen angelagert hat.

Die gründlich untersuchte Hypothese, das fraktale Wachstum der Calciumphosphathanteln sei auf das elektrische Feld des Kristallkeims zurückzuführen, wurde widerlegt, da die Hanteln auch bei Zusatz von in 2 M NaCl entstanden sind und die Debye-Länge bei diesen Salzkonzentrationen praktisch Null ist [270].

Arbeitshypothese zur Entstehung der Hanteln Das Wachstum der Hanteln beginnt mit einem stäbchenförmigen Kristallit als Keim. Im Falle des Calciumphosphats ist dieser in übersättigter Lösung mit einer amorphen Schicht überzogen [118]. Diese Schicht beginnt zu kristallisieren und am Kristallkeim anzuwachsen. Dabei müssen Protonen abgegeben werden (siehe Abschnitt 3.1.3). Des weiteren gibt es eine aus circa zwei Molekülschichten bestehende Wasserhülle um das Stäbchen [272]. Diese nimmt die Protonen auf und bildet eine Barriere, die die weitere Anlagerung von Ionen erschwert (siehe Nernst'sche Diffusionsschicht). Die Hülle zeigt an den Ecken bzw. Spitzen der Stäbchen das schwächste Potential. Neue Ionen erlangen über diese Schwachstellen Zugang und gelangen unter dieser Hülle zur Oberfläche des Stäbchens. Untersuchungen von *Pollack et al.* mit einem Keil aus Nafion in einer Suspension aus negativ geladenen *Microspheres* zeigen, wie eine durch das Oberflächenpotential des Keils geschaffene, geordnete Wasserschicht die *Microspheres* bis auf eine Distanz von 400 µm verdrängt. An einer scharfen Kante ist der Abstand zwischen dem Nafionkeil und der Suspension deutlich geringer [277]. Biomoleküle wie Polymere, Proteine oder Tenside stabilisieren möglicherweise die Hülle, sind aber nicht notwendig, um eine Barriere aufzubauen. Zwischen dem Stäbchen

²Block-Copolymer: Poly(Ethylen glycol)-block-poly(methacryl Säure), PEG-b-PMAA, PEG = 3000 g/mol, PMAA = 700 g/mol

und der Hülle sammelt sich so eine Schicht amorphen Calciumphosphats an, die vermutlich auch Wasser und evtl. die Zusätze (Fetuin, Blockcopolymer, Tenside) enthält. Die Ionen des Salzes haben auf der Kristalloberfläche eine eingeschränkte Mobilität. Nur wenige wandern, von den Enden des Stäbchens kommend zu dessen Mitte. Möglicherweise gibt es Kapillarkräfte, die diese Bewegung begünstigen. Auf diese Weise bildet sich ein keilförmiges Reservoir aus ACP, das an der Stelle, an der die Ionen des Salzes Zugang haben, am mächtigsten ist. Die energetisch günstigste Kristallisierungsrichtung für das neu angelagerte Material verläuft mit der c-Achse entlang der längsten Ausdehnung des Reservoirs. Auf Grund einer ACP-Schicht (mit den jeweils möglichen Zusätzen) zwischen dem neuen Kristallit und dem vorgegebenen Stäbchen ist der neue Kristallit nicht an die vorherige Gitterrichtung gebunden.

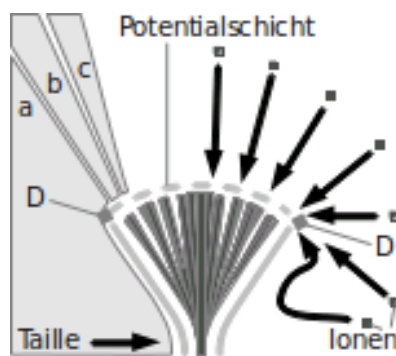


Abbildung 3.29: Modell zur Entstehung hantelförmiger Strukturen aus Salzen. Eine geladene Schicht (hellgraue Linie), evtl. auch mit Biomolekülen, schützt die Hantel vor der zufälligen Anlagerung von Ionen. An den Ecken können sich Ionen (dunkelgraue Quadrate) an die Hantel anlagern. Die Einzugsbereiche von Ionen (hellgraue Flächen a, b und c) für das Hantelwachstum ist für die unterschiedlichen Stellen der Hantel unterschiedlich groß.

Nun stellt sich die Frage, weshalb nicht das Längenwachstum des Keims dominiert und sich dieser stattdessen auffächert und kugelartig schließt. Betrachtet man eine Hantel als zwei punktsymmetrisch angeordnete Kugelsegmente, kann das Objekt in der schlanken Mitte als Taille beschrieben werden. Die Aussenflächen einer sich schließenden Kugel (=Kugeloberfläche) sind dabei durch die vielen kleinen Tochterkristallite hoch porös und haben eine sehr große Oberfläche. So können viele Ionen aufgenommen werden, ohne dass der Kugelradius signifikant zunimmt. Des Weiteren wirkt die konvexe Form der Kugelaußenfläche schwächend auf die Potentialbarriere. Die konkave Form der Taille hingegen unterstützt eine geschlossene Potentialschicht. In diesem Bereich lagern sich praktisch keine Ionen an. Dies führt dazu, dass die Volumina, aus denen die Ionen zu den unterschiedlichen Mineralisierungsorten der Hantel fließen, unterschiedlich groß sind. An den äußeren Rändern der Kugelsektoren (Punkt D in Abbildung 3.29) erhalten auch die Ionen Zugang zur Hanteloberfläche, die im Bereich der Taille durch die stabile Potentialschicht blockiert werden (siehe Abbildung 3.29, Bereich a), während in der Mitte der Kugeloberfläche ein relativ kleiner Volumenbereich einer relativ großen Mineraloberfläche gegenübersteht (siehe Abbildung 3.29, Bereich b und c).

Die folgende Tabelle 3.8 vergleicht die Aussagen der Arbeitshypothese mit den gemachten Beobachtungen und den in der Literatur publizierten Erkenntnissen zur Entstehung von hantelförmigen Kristall-Aggregaten.

Tabelle 3.8: Vergleich der Aussagen der Arbeitshypothese zur Entstehung der Hanteln mit Beobachtungen und Angaben aus der Literatur.

Hypothese	Beobachtung
Um den Keim muss sich eine Potentialschicht bilden, dafür sind Anionen nötig, die Protonen aufnehmen und abgeben können, z.B. PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , evtl. SO_4^{2-}	Verschiedene Salze können Hanteln bilden: CaHPO_4 [200, 219, 40], BaHCO_3 [270]
Die Potentialschicht muss am äußeren Rand eines Kugelsegments dünner sein um Ionen den Durchgang zu ermöglichen	Untersuchungen mit einem Keil aus Nafion in einer Suspension aus negativ geladenen <i>Microspheres</i> zeigen, dass die Abstoßung der <i>Microspheres</i> an einer Spitze deutlich geringer ist, als entlang einer glatten Kante [277]
Verschiedene Moleküle begünstigen den Prozess und bilden möglicherweise eine Hülle um das Calciumphosphat, sind aber keine Voraussetzung für die Entstehung von Hanteln	Wachstum von Hanteln in Anwesenheit von Fetuin, Blockcopolymeren, Gelatine, Tensiden und ohne Zusatz
ACP als Milieu des neuen Tochterkristallits und als Zwischenschicht zum Mutterkristallit	Winkel zum Mutterkristallit, die Gitterausrichtung wird nicht übernommen
Mit zunehmender Größe der Hanteln steigt die Oberfläche, die Barrierschicht wird dünner und instabiler	Stäbchen werden im Verlauf des Hantelwachstums kleiner und/oder spitzer
Die Kristallastdicke ist proportional zur Akkumulation des amorphen Salzes am Mutterkristall. Hierbei verhindern Zusatzmoleküle meist eine Kristallisierung und es kommt zu dickeren Stäbchen	$\text{CaHPO}_4 + \text{Gelatine} \rightarrow \text{dick}$; BaCO_3 in Wasser \rightarrow sehr dünn; $\text{BaCO}_3 + \text{Blockcopolymer} \rightarrow \text{mittel}$; CaPO_4 in Wasser an Ti \rightarrow dünn $\text{CaPO}_4 + \text{Fetuin} \rightarrow \text{dick}$
Die Stabilität der Potentialschicht ist vom pH-Wert und der Konzentration des protonierbaren Anions abhängig	Korrelation der Erscheinungsform der Hanteln mit pH und Ionenkonzentration [200, 219]
Die neu entstehenden Kristallite sind etwas kleiner als ihr Vorgänger, bis eine Minimalgröße erreicht ist. Dann sind die Kristallite so instabil, dass sich der Radius der Hantel nicht mehr vergrößert.	Die Größe der Hanteln variiert innerhalb einer Präparation kaum [270, 200, 219, 39, 40]
So lange eine leicht wachstumshemmende Hülle die Kristalloberfläche umgibt, beeinflussen Fremdionen diesen Prozess kaum	Selbst große Mengen (z.B. 2 M) NaCl oder KNO_3 haben einen geringen Einfluß auf die Bildung der Hanteln [270].

3.4 Osteocalcin

3.4.1 Osteocalcin im MALDI-MS

Die Masse von Osteocalcin wurde mit MALDI-MS überprüft, dabei wurden einfach und doppelt geladene Ionen von Osteocalcin im Spektrum beobachtet (siehe Abbildung 3.30). Das Signal mit der Maximalintensität bei m/z 5723 entspricht der decarboxylierten Form von Osteocalcin $[M + O - 3 \text{ CO}_2]^{2+}$. Der komplette Verlust der $-\text{CO}_2$ -Gruppen war vermutlich eine Folge der Ionisierung auf Grund von Kollisionen mit anderen Ionen oder des Lasers und wurde auch von anderen Wissenschaftlern beobachtet [128]. Die Signale aus den Massenspektren bei m/z 5706 und 5690 waren wahrscheinlich die Folge weiterer Sauerstoffverluste nach der Ionisierung der Moleküle. Um eine schonendere Ionisierung ohne Decarboxylierung während der Ionisation zu erreichen, wurden ESI-MS-Messungen angefertigt.

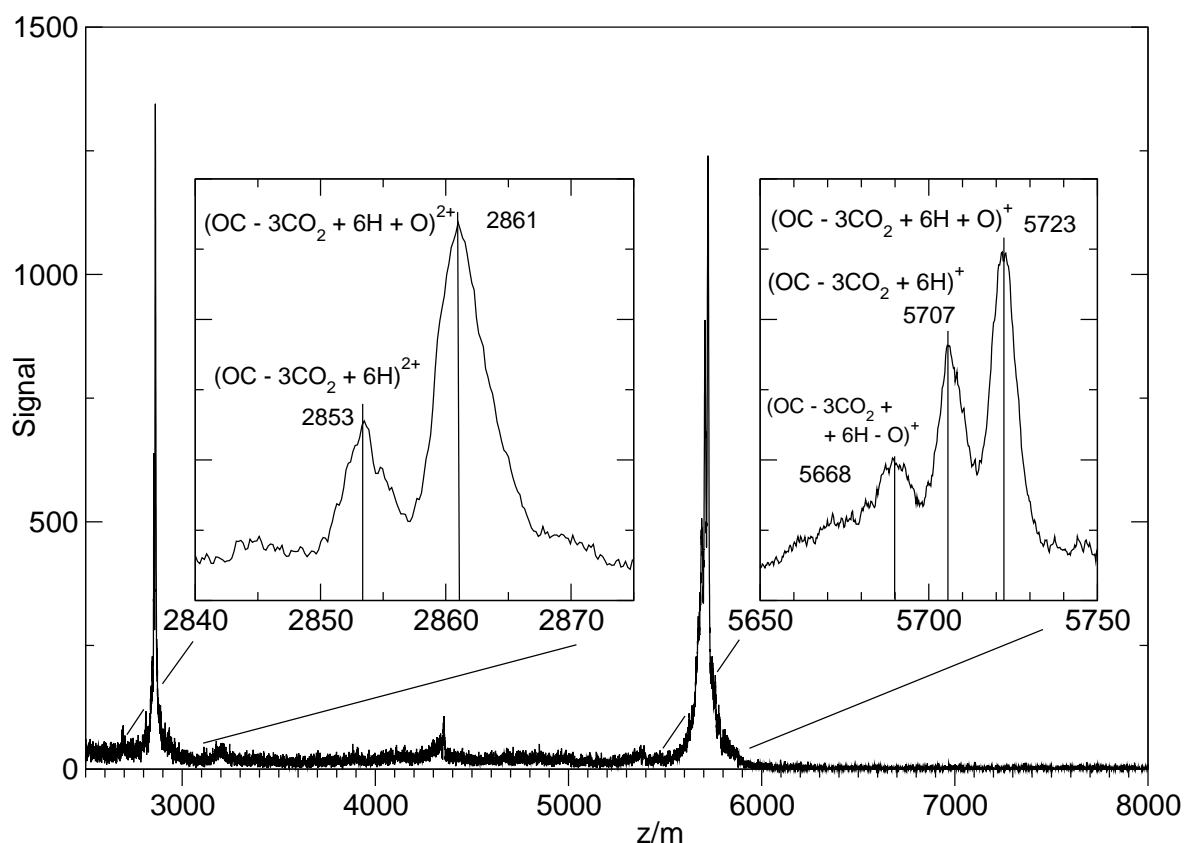


Abbildung 3.30: Osteocalcin im MALDI-MS. Die Abspaltung einer Carboxylgruppe $\text{Glu} \rightarrow \text{Glu} + \text{CO}_2$ reduziert die Masse um 44 Da.

3.4.2 Osteocalcin im ESI-MS

Osteocalcin Das Massenspektrum von Osteocalcin (OC) ohne Zusätze zeigt die Auflösung der Messung und die Masse des Proteins in 0,025% Ameisensäure mit einer Ladung von +4 bis +7. Das stärkste Signal entsprach dem Molekularion $[M + 5 \text{ H}]^{5+}$ bei m/z 1171 und

gab die durchschnittliche Masse von 5833,70 wieder, die der Masse von Osteocalcin mit drei Gla-Resten und einem Sauerstoff entsprach. Obwohl die Probe über Nacht gegen Aq. dest. dialysiert wurde, um das Calcium aus der Pufferlösung in der das Protein geliefert wurde, zu entfernen, war noch ein Komplex mit einem, bzw. zwei Calciumionen im Spektrum sichtbar. Offenbar war die Bindung dieses Kations so groß, dass ein geringer Anteil der Kationen per Dialyse nicht entfernt werden konnte. In den ESI-Spektren bei denen Calcium direkt zur Probe hinzugefügt wurde, konnten Massen bis $M + 3 \text{ Ca}^{2+}$ detektiert werden. Mehrere Versuche, mit definierten $\text{Ca} : \text{P}_i$ -Verhältnissen in der Probelösung einen Ionenkomplex zu erhalten, der über die mit Phosphoserin erhaltenen Komplexe hinaus geht, ergaben höchstens die Anlagerung eines Phosphats und weniger Kationen. Komplexe mit Na^+ oder Osteocalcindimere wurden nicht detektiert (Spektrum siehe Abbildung 3.31, Präparation siehe 2.5.3).

Osteocalcin in gesättigter Calciumphosphatlösung Das Potential von Osteocalcin als Nukleationskeim für Calciumphosphatkristalle wurde erst mit der Messung des Proteins in gesättigter Calciumphosphatlösung offenbart. In Abbildung 3.32 zeigen die nach oben gerichteten Signale das gemessene Spektrum, die nach unten gerichteten die Simulation [212]. Bei der Simulation wurde stets darauf geachtet, dass der Ionenkomplex die Ladung +4 hat. Veränderungen, die durch Hinzufügen von Ionen entstanden, wurden durch Hinzufügen oder Abziehen von Protonen ausgeglichen. Das ungeladene Osteocalcin hatte ein Molekulargewicht von 5833,7 Da, dies stimmt mit Werten aus der Literatur und den Lieferangaben überein. Mit steigender Größe des Ionenkomplexes nahm die Signalintensität und somit dessen Häufigkeit ab. Der stärkste Peak in diesem Spektrum war der $\text{OC} + \text{O}$ Peak, eine einfach oxidierte Form des Osteocalcins. Die starke Affinität zu Ca^{2+} wurde deutlich, da die vier häufigsten Komplexe durch Bindung von Calcium entstanden. Die Bindung von Na^+ war auch dann schwächer, wenn beide Kationen gleichzeitig an das Osteocalcin Adsorbierten. Erst mit dem Auftreten des Phosphats bei m/z 1516 waren die Signalintensitäten der Komplexe mit Na^+ etwa genauso stark wie die der reinen Calciumphosphatkomplexe. Der größte gut zuzuordnende Komplex bestand aus $\text{OC} + 2 \text{ Ca} + 4 \text{ Na} + 2 \text{ PO}_4$ mit der Masse 1553,4. Oberhalb von m/z 1555 waren die Signale nicht mehr vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Eine Tabelle der dedektierten Massen sowie der zugeordneten Ionenkomplexe ist auf Seite 105, eine Auflistung der Aminosäuresequenz von Osteocalcin ist auf Seite 168 zu finden.

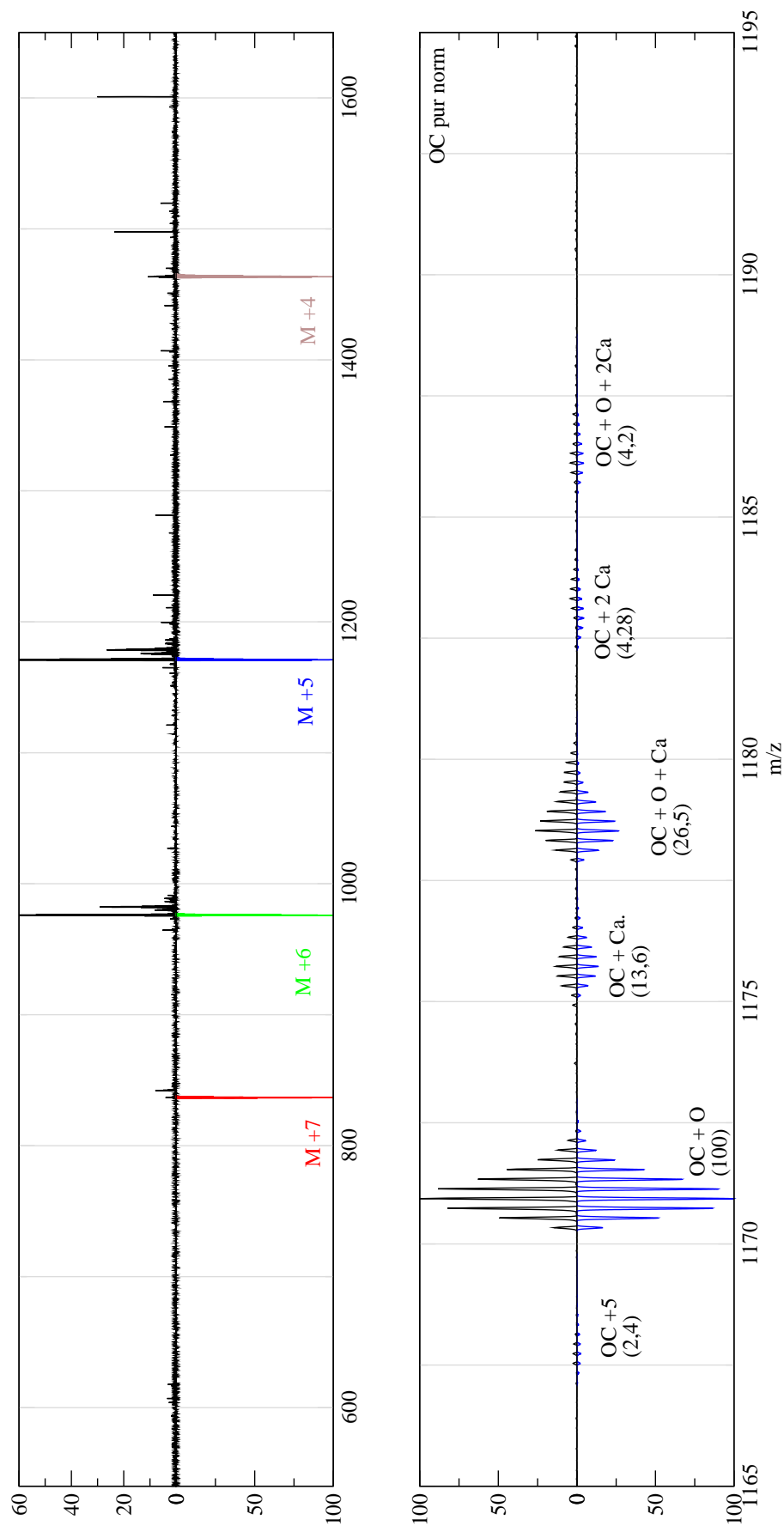


Abbildung 3.31: ESI-Massenspektrum von Osteocalcin. Der jeweils obere Graph in schwarz zeigt die Messung, der Untere in Farbe eine Simulation. In runden Klammern ist die Intensität relativ zum größten Peak des gemessenen Spektrums angegeben.

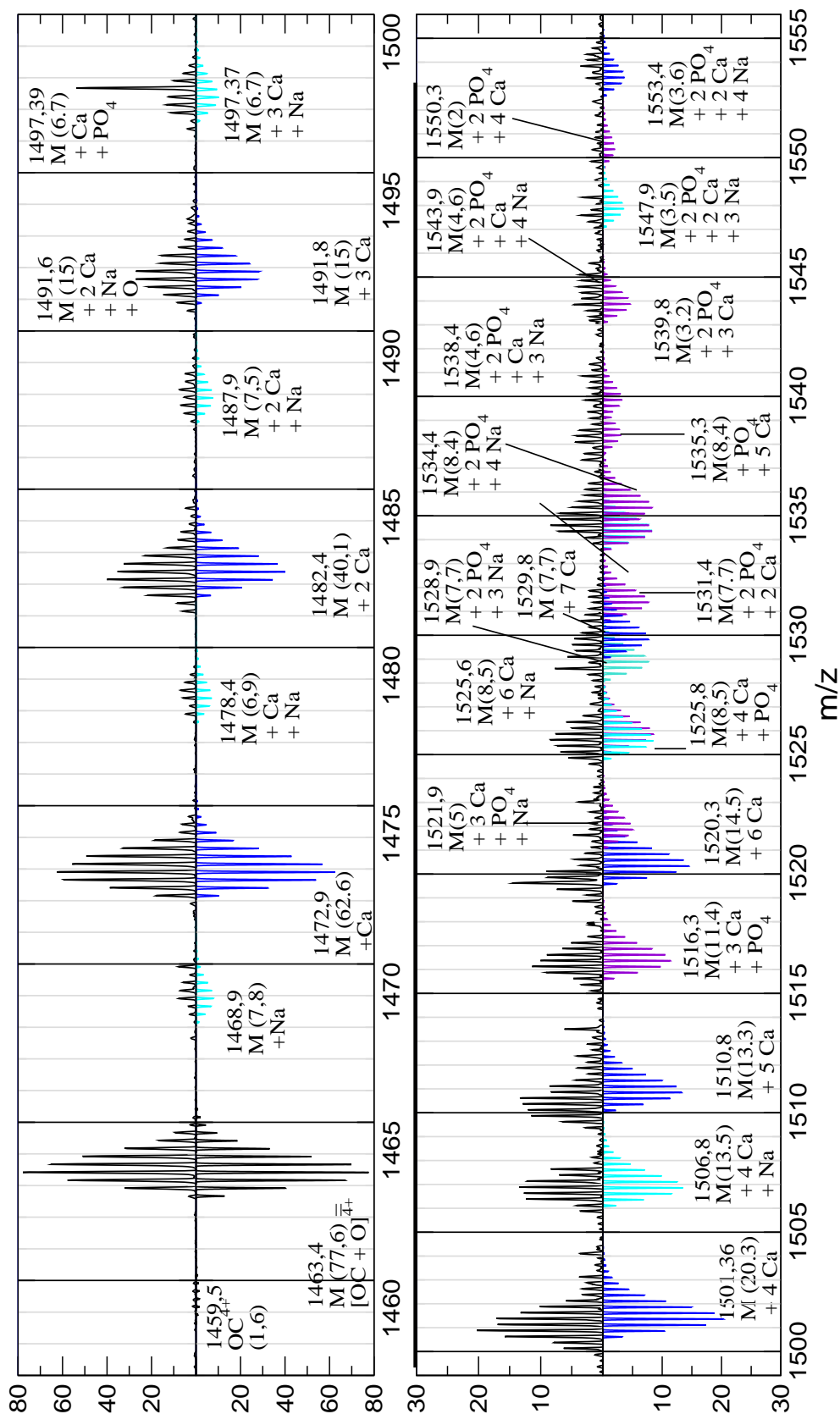


Abbildung 3.32: Osteocalcin in gesättigter Calciumphosphatlösung im ESI-MS, Darstellung der vierfach positiv geladenen Komplexe. Der jeweils obere Graph in schwarz zeigt die Messung, der Untere in Farbe die Simulation. In runden Klammern ist die Intensität relativ zum größten Peak des gesamten gemessenen Spektrums angegeben ($= 1170,94 = [M + O]^{+5}$, in diesem m/z -Abschnitt nicht sichtbar). Die Farben geben Gruppen ähnlicher Komplexe wieder: schwarz: Osteocalcin ohne Ionen; blau: $M + n Ca^{2+}$; cyan: $M + n Ca^{2+} + Na^+$, vermischt sich ab $3 Ca + Na$ mit anderen Signalen; lila: $M + PO_4^{3-} + n Ca^{2+} + n Na^+$; magenta: $M + 2 PO_4^{3-} + n Ca^{2+} + m Na^+$.

Tabelle 3.9: Osteocalcin in gesättigter Calciumphosphatlösung im ESI-MS. Die Komplexe haben jeweils die Ladung +4, sofern nicht anders gekennzeichnet. I = relative Intensität

m/z	I	Ionenspezies
1170,94	100	OC + O (Ladung: +5)
1459,5	1,6	OC + 4 H ⁺
1463,5	77,6	OC + O + 4 H ⁺ (= M)
1468,9	7,8	M + Na
1472,9	62,6	M + Ca
1478,4	6,9	M + Ca + Na
1482,4	40,1	M + 2 Ca
1487,9	7,5	M + 2 Ca + Na
1491,8	30	M + 3 Ca
1491,6	30	M + 2 Ca + Na + O
1497,37	13,4	M + 3 Ca + Na
1497,39	13,4	M + Na + PO ₄
1501,36	20,3	M + 4 Ca
1506,8	13,5	M + 4 Ca + Na
1510,8	13,3	M + 5 Ca
1516,3	11,4	M + 3 Ca + PO ₄
1520,3	14,5	M + 6 Ca
1521,9	5	M + 3 Ca + Na + PO ₄
1525,6	8,5	M + 6 Ca + Na
1525,8	8,5	M + 4 Ca + PO ₄
1528,9	7,7	M + 3 Na + 2 PO ₄
1529,8	7,7	M + 7 Ca
1531,4	7,7	M + 2 Ca + 2 PO ₄
1534,4	8,4	M + 4 Na + 2 PO ₄
1535,3	8,4	M + 5 Ca + PO ₄
1538,4	4,6	M + Ca + 3 Na + 2 PO ₄
1539,8	4,6	M + 3 Ca + 2 PO ₄
1543,9	4,6	M + Ca + 4 Na + 2 PO ₄
1547,9	3,5	M + 2 Ca + 3 Na + 2 PO ₄
1550,3	2	M + 4 Ca + 2 PO ₄
1553,4	3,6	M + 2 Ca + 4 Na + 2 PO ₄

3.4.3 Zusammenfassung und Interpretation

Als häufigstes nichtkollagenes Knochenprotein zeigt Osteocalcin einen starken Einfluss auf die Calciumphosphatpräzipitation. Das Potential dieses Proteins als Nukleationskeim zu wirken, wurde mit verschiedenen massenspektroskopischen Methoden untersucht.

In den ESI-MS-Spektren war im Gegensatz zu den MALDI-MS Spektren keine Abspaltung der CO₂-Gruppen aus den γ -carboxylierten Glutaminsäuren zu erkennen. Das ESI-Massenspektrum zeigte bei einer Ladung von +4 die größten Komplexe. Im Gegensatz zu den Phosphoserinspektren waren hier die Komplexe mit Ca²⁺ deutlich stärker als solche mit Na⁺. Erst mit dem Auftreten von Phosphat zeigten die Spektren mit Natrium die gleiche Intensität wie die Signale mit Calcium. Der größte gut zuzuordnende Komplex besteht aus

zwei Phosphat-, zwei Calcium- und vier Natriumionen sowie einem Osteocalcin-Molekül.

Im Gegensatz zu *Nousiainen et al.*, die bei ESI-MS Messungen von Osteocalcin mit Ca^{2+} ein Maximum bei drei assoziierten Ca^{2+} gefunden hatten, lässt hier die Signalintensität mit steigender Größe des Komplexes nach [173]. Auch ein Osteocalcin-Dimer, dessen Existenz per NMR und ESI-MS nachgewiesen wurde, konnte hier nicht detektiert werden [116, 173].

Zwar gaben die Massenspektren keinen direkten Hinweis auf den Ort der Ionenanlagerung, jedoch ist es höchst wahrscheinlich, dass sich der Komplex an der Außenseite der ersten und zweiten α -Helix des Osteocalcins bildet [58, 103]. Das erste Phosphat lagert sich frühestens nach dem dritten Ca^{2+} an, das zweite Phosphat schon nach dem vierten Ca^{2+} .

3.5 Kollagen

Der genaue Aufbau des Kollagen-Calciumphosphat Kompositmaterials, aus dem unser Knochen besteht ist trotz intensiver Bemühungen in der Forschung noch nicht im Labor rekonstruierbar. Speziell die Entwicklung im Nanometermaßstab, die Ausprägung der Kristallite und deren Wechselwirkung mit den Kollagenfibrillen, die für die spezifischen Eigenschaften des Knochens entscheidend ist, gibt den Wissenschaftlern noch Rätsel auf. Um die Mineralisierung von Kollagenfibrillen zu beobachten wurden Kollagenmonomere nach der Vorschrift von *Bradt et al.* ohne Ca^{2+} assembliert [34] und für AFM-Untersuchungen mit verschiedenen Methoden mit Calciumphosphat nachmineralisiert, um Ort und Morphologie eines Kristallwachstums zu bestimmen.

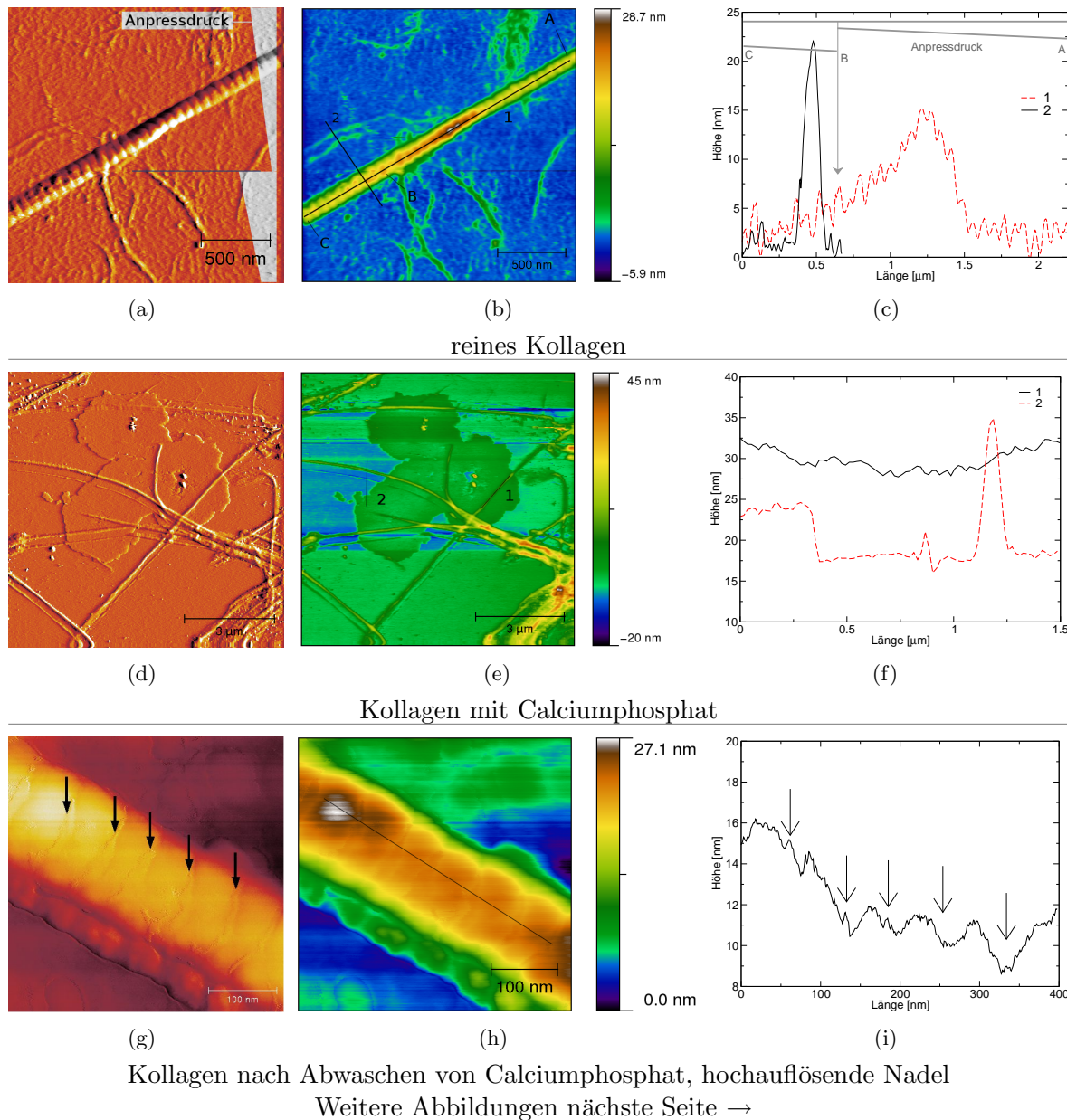
3.5.1 Kollagen mit Calciumphosphat

Eine typische nicht mineralisierte Kollagenfibrille ist auf Seite 108 in der obersten Reihe zu sehen (Abb. 3.33(a)-3.33(c)). Die nach der Assemblierung zusätzlich vorhandenen kleineren Fibrillen und Kollagenmonomere sind im Hintergrund sichtbar. Die Nadel wurde in dieser Abbildung von oben nach unten geführt, dabei wurde der Anpressdruck nach unten hin schwächer. Kurz nach der Mitte wurde der Anpressdruck wieder erhöht. Die Breite des hellen Bereichs am rechten Bildrand repräsentiert den Anpressdruck der Nadel auf die Probe (Abb. 3.33(a)). Der leichte Anpressdruck machte sich an der Fibrille durch rundliche Formen bemerkbar, der starke Druck im unteren, rechten Bereich der Abbildung führte zu einem kantigen Eindruck der Fibrille. Die Tiefe der Bänderung betrug bei dieser Fibrille 1-2 nm, der Durchmesser etwa 20 nm. Je nach Fortschritt der Assemblierung können diese Werte variieren.

Bei den Abbildungen 3.33(d)-3.33(f) in der zweiten Reihe wurde auf die Kollagenfibrillen ein Tropfen Calciumphosphatlösung gegeben und bei Raumtemperatur eingetrocknet. Zwischen den Fibrillen waren unregelmäßige Flächen von ca. 7 nm Dicke zu erkennen. Da Calciumphosphat der einzige Zusatz zu den Fibrillen war, kann angenommen werden, dass es sich hier um amorphes Calciumphosphat handelt. Die Bänderung war nur noch schwach erkennbar, dies spricht für eine Affinität zu den Zwischenräumen. Auffällig war, dass sich praktisch keine ACP-Kugeln gebildet hatten. Es ist keine besondere Korrelation zwischen den Kollagenfibrillen und dem Calciumphosphat zu erkennen.

Die auf den Abbildungen 3.33(g)-3.33(i) dargestellte Fibrille wurde nach dem Eintrocknen der Calciumphosphatlösung mehrmals mit einem Tropfen destillierten Wassers gespült und dann bei 37°C luftgetrocknet. Die Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden Nadel (Spitzenradius ca. 1 nm) angefertigt. Zwischen den erhöhten Bereichen sind in den Vertiefungen der Bänderung kleine Säume zu erkennen (Pfeile), von denen bereits als X₁-Saum berichtet wurde [203, 94]. Dieser kommt vermutlich durch die etwas breiteren Enden der Kollagenmonomere zustande. Eine Mineralisierung ist nicht erkennbar.

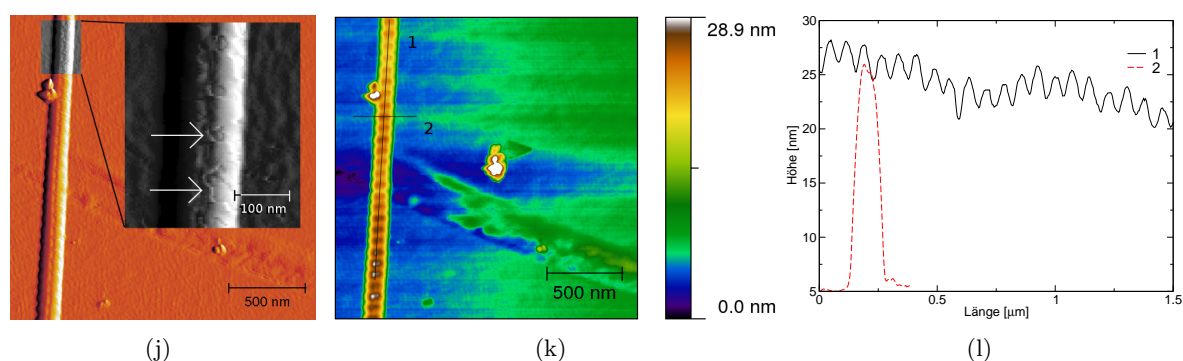
Eine Probe mit assemblierten Kollagenfibrillen wurde über 12 h in eine gesättigte Calciumphosphat-Lösung im Kühlschrank eingelegt und nach vorsichtigem Trockenblasen bei 37°C



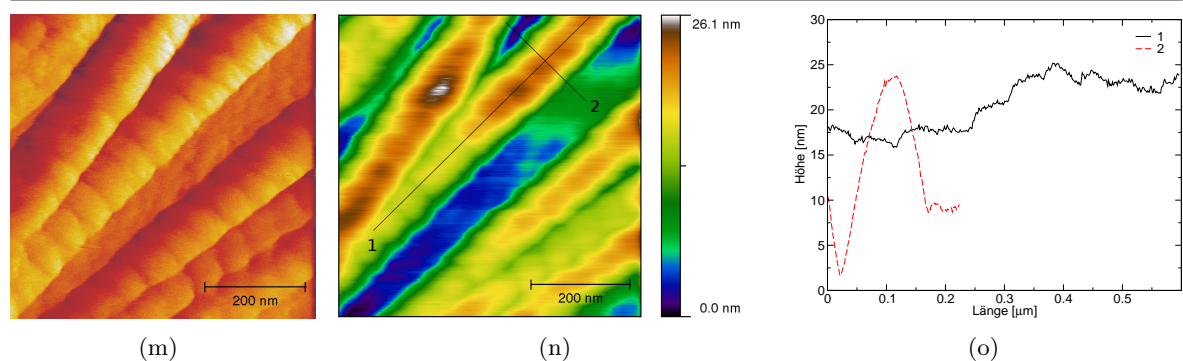
getrocknet. Daraufhin erschien das typische Rillenmuster der Fibrillen gedämpft (Abbildungen 3.33(j)-3.33(l)). Des Weiteren waren auf der Fibrille Ränder zu erkennen (weiße Pfeile, Abb. 3.33(j)), die typischerweise durch Abkratzen einer dünnen Schicht durch die AFM Nadel entstehen. Wahrscheinlich hatte sich eine amorphe Schicht von Calciumphosphat eng und gleichmäßig auf die Fibrille gelegt.

Wurden die Fibrillen statt bei 4°C bei Raumtemperatur inkubiert ist das Ergebnis ähnlich. Die Abbildungen 3.33(m)-3.33(o) zeigen im Vergleich mit der nicht mineralisierten Kollagen-Fibrille deutlich kleinere Rillen, die Ringe erschienen gequollen. Die Profile zeigen, dass die Fibrille etwa den gleichen Durchmesser wie die oben abgebildeten Fibrillen hat, allerdings sind die Grabenregionen kaum noch erkennbar.

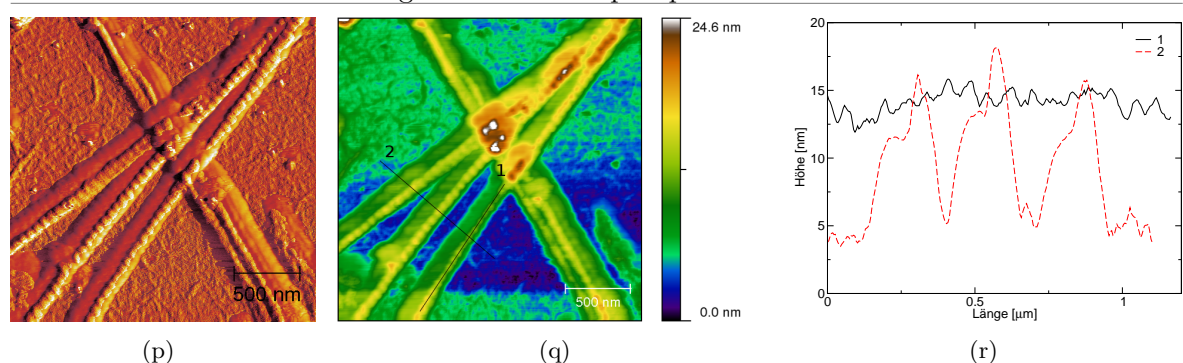
Auf den Abbildungen 3.33(p)-3.33(r) wurde ein 30 μ l Tropfen gesättigter Calciumphos-



Kollagen nach 12 h Inkubation in Calciumphosphat-Lösung



Kollagen mit Calciumphosphat inkubiert

Kollagen mit amorphem Calciumphosphat
Abbildung 3.33: Kollagen mit Calciumphosphat

phatlösung auf einem Si-Waver mit assembliertem Kollagen eingetrocknet. Die vier Fibrillen wurden mit starkem Anpressdruck der AFM-Nadel aufgenommen und zeigen das kollagentypische Rillenmuster, vor allem an den erhöhten Bereichen (> 10 nm). In flacheren Bereichen hat sich amorphes Material an die Fibrillen angelagert. Vermutlich waren die Fibrillen in der Lösung komplett mit amorphem Calciumphosphat umgeben, welches sich während des Trockenvorgangs weiter nach unten abgesetzt hat.

3.5.2 Kollagen mit Phospholipiden

In der Literatur finden sich immer wieder Hinweise, dass die Mineralisierung von Kollagen durch Lipide, bzw. Phospholipide gefördert wird [189, 267]. Die Abbildungen 3.34 zeigen das Ergebnis des Versuchs, Kollagenfibrillen mit Hilfe von calciumphosphathaltigen Vesikeln zu

mineralisieren (Präparation siehe 2.8.4). Schon 20 min nach Einspritzen der Vesikellösung in die Flüssigzelle des AFMs waren horizontale Verzerrungen an der Fibrille zu erkennen, die höchstwahrscheinlich auf die Schereinwirkung der sich horizontal bewegenden Nadel und ein Aufweichen der Fibrille zurückzuführen sind 3.34(b). Diese Verzerrungen verstärkten sich im Laufe einer Stunde, ohne aber die Fibrille zu zerstören. Der Verlauf der Fibrille bleibt unverändert (Abbildung 3.34(c) bis 3.34(d)).

3.5.3 Zusammenfassung und Interpretation

Die Mineralisierung von Kollagenfibrillen ist ein wichtiger Prozessschritt bei der Bildung von Knochen und der Herstellung von Knochenersatzmaterialien. Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden einer Nachmineralisierung von assemblierten Kollagenfibrillen mit dem AFM untersucht.

Meist bildete Calciumphosphat eine amorphe Schicht um die Kollagenfibrillen. Ein Wachstum von Kristalliten an den Fibrillen wurde nicht beobachtet. Unter dem Gesichtspunkt, dass Kollagen nicht nur im Knochen, sondern im gesamten Organismus (z. B. Bindegewebe, Haut) sehr verbreitet ist, erscheint dieses chemische Verhalten sinnvoll, da es andernfalls leicht zu einer ektopischen Mineralisierung kommen könnte. Die Funktionalisierung von Fibrillen mit Glucuronsäure zeigte hingegen gute Erfolge bei der Züchtung von Calciumphosphatkristalliten an Fibrillen [68, 69]. In der Biologie ist der hohe Mineralisierungsgrad der Kollagenfibrillen ein Resultat eines langsamen Prozesses, der mindestens mehrere Tage, vermutlich Wochen bis Monate andauert. Dabei wird wahrscheinlich eine wasserreiche Calciumphosphat-Phase, wie von *Olszta et al.* [176] vorgeschlagen, durch Kapillarkräfte in die Fibrille hineingesogen. Phospholipide könnten diesen Mineralisierungsschritt unterstützen, indem sie die Fibrillen aufweichen und ausdehnen und so den Zugang für das Calciumphosphat erleichtern. Bei der Verdrängung des in der Fibrille vorhandenen Wassers könnten die einzelnen Kollagene wie ein Filter wirken und das Calciumphosphat zurück halten [176]. Die Ausbildung der Kristallite erfolgte dann auf Grund einer Verdichtung des Materials und auf Grund mechanischer Einwirkung [75, 141].

Alternativ könnte das Calciumphosphat schon während der Assemblierung in die Fibrille eingebaut werden und die Ausrichtung der Kristallite folgt der Ladungsverteilung der Kollagenfibrillen (templating). Auch eine Kombination dieser beiden Mechanismen ist denkbar.

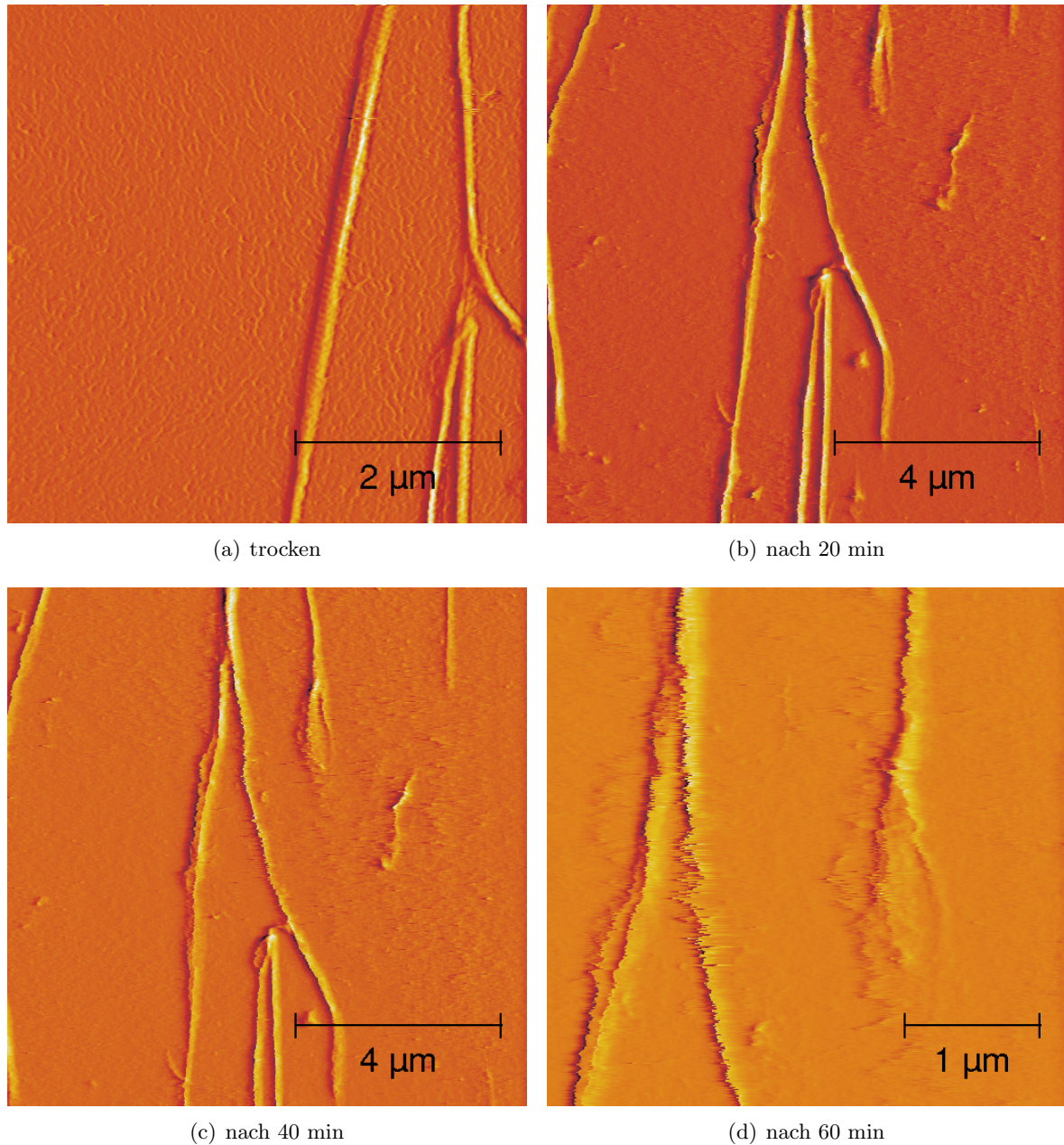


Abbildung 3.34: Kollagen in der Flüssigzelle eines AFMs nach der Inkubation mit einer Lösung, die Vesikel aus Phospholipiden (DPPC), gefüllt mit Calciumphosphat Stammlösung, enthält. Die Fibrille wird im Laufe der Zeit weicher, bleibt aber intakt und behält ihre Position bei.

3.6 Künstliche Vesikel

In biologischen Systemen findet die Mineralisation häufig in extrazellulären Matrixvesikeln statt oder wird durch diese vermittelt [135, 142, 189, 265]. Auch wenn das Züchten von Calciumphosphatkristallen in Vesikeln schon seit den 70er Jahren, vor allem von *Eanes et al.* vorangetrieben wurde [224, 100, 64, 63, 60, 61], sind erstaunlich wenige REM- und AFM-Abbildungen vorhanden. In vorhergehenden Publikationen wurden meist TEM Abbildungen gezeigt, die zwar den Vorteil haben, dass sie einen Blick in die Vesikel gewähren, allerdings gehen auch viele Details wie Oberflächenstruktur, Faltung und ein dreidimensionaler Eindruck, verloren.

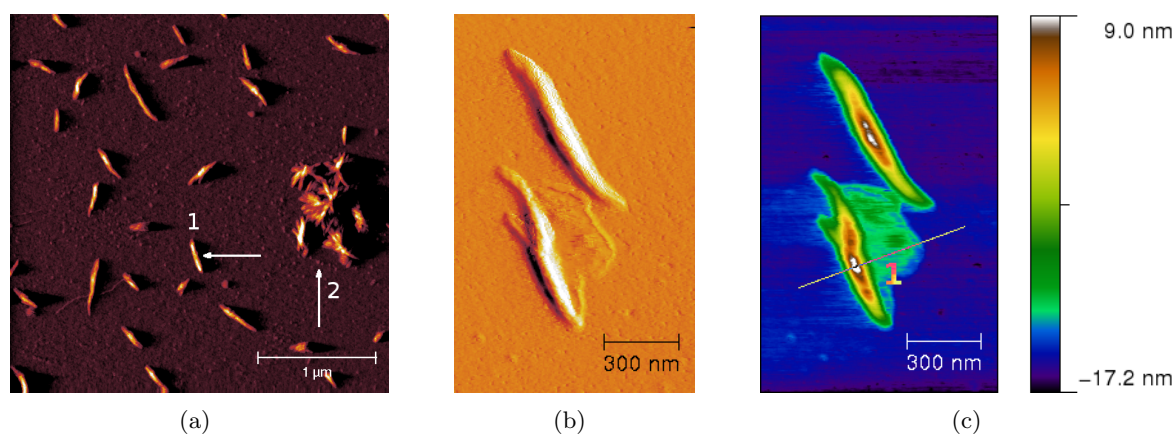
Als Modell für diese extrazellulären Matrixvesikel wurden künstliche Vesikel aus Phospholipiden hergestellt. Da die Membran selbst nicht Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit war, wurde ausschliesslich DPPC als Membranbildner verwendet. Die Vesikelmembranen wurden mittels Ionophoren permeabel für Ca^{2+} und K^{+} Ionen gemacht. Im Zusammenhang mit DPPC hat sich für den Ca^{2+} Transport Calcimycin (A23187) bewährt [10]; dieses unterstützt auch den Abtransport von Protonen aus den Vesikeln. Als Ionophore für Kalium diente Valinomycin. Die detaillierte Präparation ist auf Seite 27 beschrieben.

Vesikel mit Wasser Die Abbildungen 3.35(a) bis 3.35(g) zeigen Vesikel ohne mineralischen Inhalt; sie wurden aus wässriger Lösung getrocknet.

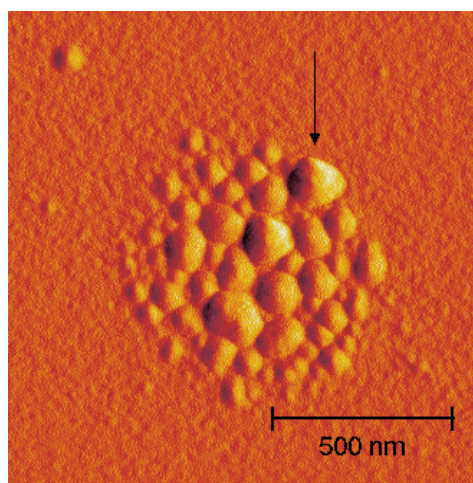
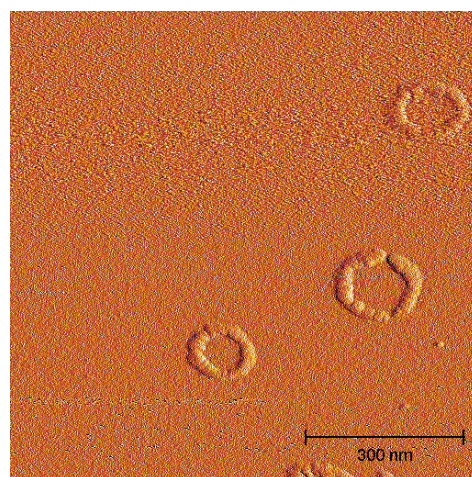
Auf den ersten drei Abbildungen sind die Vesikel zu leicht gebogenen Zigarren von etwa 500 nm Länge zusammengefallen. Teilweise sind lappenartige Fortsätze zu erkennen. Hier wurde offenbar ein Teil der Vesikelmembran erhalten. Der auf Abbildung 3.35(c) sichtbare Fortsatz hatte eine Dicke von ca. 3 nm und wurde somit aus einer Doppelmembran aufgebaut [181, 258, 17], während die „Zigarre“ selbst etwa 25 nm Durchmesser aufwies. Wurden die Vesikel gefriergetrocknet, änderte sich die Erscheinungsform deutlich. Die runde Ansammlung von Aufwölbungen wird als „Scherbenhaufen“ der Vesikelwand interpretiert (Abbildung 3.35(d)). Beim schnellen Einfrieren der Vesikel in N_2 (l) und nachfolgendem Gefriertrocknen wurden die Vesikel nicht immer besser erhalten als beim Eintrocknen an Luft oder im Trockenofen (37°C). Ein Beispiel guter Vesikelerhaltung ist auf Abbildung 3.35(e) zu sehen. Der Rand der dort sichtbaren Ringe war mit 3-4 nm deutlich flacher als der Durchmesser der „Zigarren“.

Vergleichbare Strukturen lassen sich auch im REM abbilden. Auf der REM-Aufnahme 3.35(f) sind wieder zusammengefaltete Vesikel zu sehen. Im unteren Bereich der Abbildung war ein Vesikel noch teilweise erhalten. Die REM-Aufnahmen der schnell eingefrorenen Vesikel zeigen eine weitgehend intakte Membran der Vesikel (Abbildung 3.35(g)).

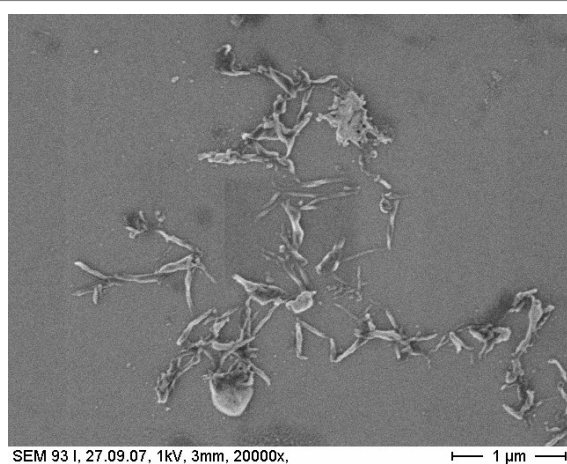
Im Allgemeinen ist die Erscheinungsform der Vesikel recht unterschiedlich, gemeinsam haben jedoch alle Formen, dass kein Hinweis auf eine Füllung gegeben war.



Vesikel aus destilliertem Wasser, luftgetrocknet

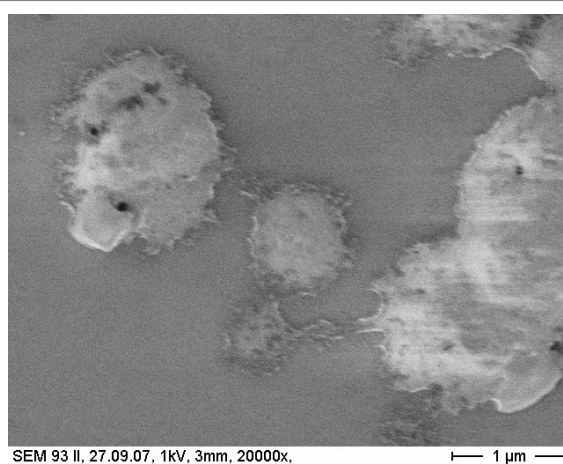
(d) Eingefroren (-18°C) und lyophilisiert(e) In $\text{N}_2(\text{l})$ eingefroren und lyophilisiert. Der Rand hat eine Dicke von ca 4 nm

Vesikel in Aq. dest. hergestellt, gefriergetrocknet



SEM 93 I, 27.09.07, 1kV, 3mm, 20000x,

(f) luftgetrocknet



SEM 93 II, 27.09.07, 1kV, 3mm, 20000x,

(g) In $\text{N}_2(\text{l})$ eingefroren und lyophilisiert

Abbildung 3.35: Typische Erscheinungsformen von Vesikeln in Wasser

Vesikel mit Calciumphosphat Die Abbildungen 3.35(a) bis 3.35(g) zeigen auf Si-Waver eingetrocknete Vesikel ähnlicher Größe, die unterschiedliche Pufferlösungen enthielten (Präparation siehe Tabelle 2.5, Zeile 6 bis 9). Die Bilder der obersten Reihe charakterisieren ein Vesikel aus wässriger Lösung. Die Erhebungen lagen mit 15 nm unter denen der anderen Vesikel und sind vermutlich auf verklumpte Vesikelmembranen zurückzuführen (Abbildung 3.36(a)). In der zweiten Reihe ist ein Vesikel mit einer K_2HPO_4 -Lösung als Füllung zu sehen. Die Verklumpung war mit einer Höhe von 23 nm deutlich größer als im vorherigem Beispiel. Da Phosphat etwas hydrophil ist, könnten auch erhöhte Mengen adsorbierten Wassers die Aufwölbung verursachen (Abbildung 3.36(d)).

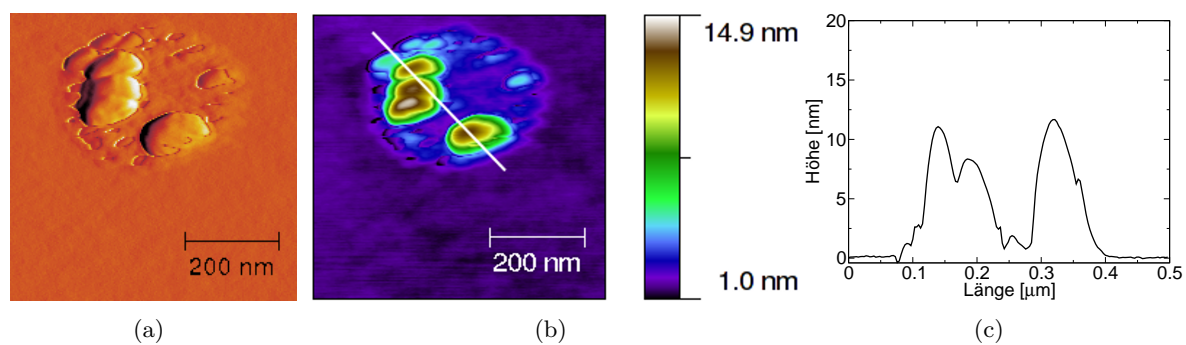
In den Abbildungen 3.36(g) bis 3.36(i) ist ein Vesikel mit Calciumphosphatlösung als Füllung dargestellt. Im Unterschied zu den vorher beschriebenen Vesikeln ist hier eine relativ gleichmässige Verteilung von Agglutinationen, deren Durchmesser zwischen 60 und 90 nm schwankt, zu erkennen. Da die eingeschlossene Menge des Calciumphosphats nicht ausreichte, um Kristallite in dieser Größe und Anzahl zu formen, hat das eingeschlossene Salz wahrscheinlich die Vesikelwand stabilisiert, so dass diese beim Trocknen in gleich große Stücke zerbrochen war. Insgesamt erscheint das Vesikel ringförmig.

Auf der untersten Bildreihe wurde eine Calciumphosphat-Phosphoserin-Lösung in Vesikeln eingeschlossen und diese dann schnell eingefroren und gefriergetrocknet. Die erkennbaren Strukturen waren ungleichmässiger als im Beispiel ohne Phosphoserin. Die geringere Ordnung ist vermutlich auf eine Störung der Calciumphosphat-Phospholipid-Wechselwirkung zurückzuführen (Abbildung 3.36(l)).

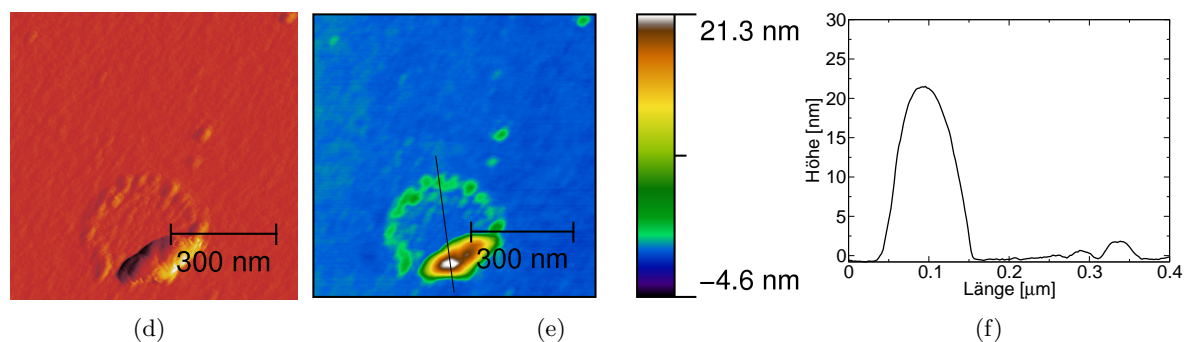
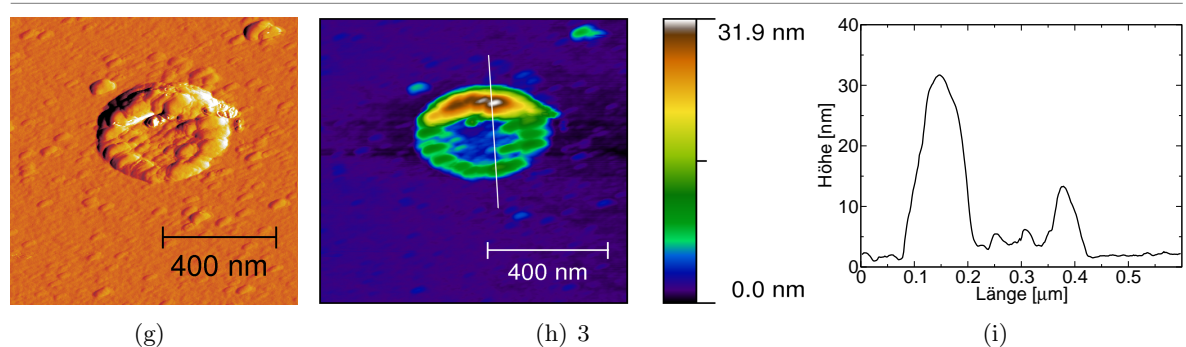
Vesikel im TEM Die Abbildung der Vesikel im TEM erfolgte nach Einbettung in Epoxydharz nach A. Spurr [230] und der Anfertigung eines Dünnschnitts (Präparation siehe 2.7). Die Ausbeute an Vesikeln mit dieser Präparationsmethode war sehr gering. Mögliche Ursachen hierfür könnten eine Zerstörung der Membran durch das erwärmte Agar sein, oder das Aceton löste die Vesikel während der Entwässerung auf.

Das in Abbildung 3.37(d) dargestellte Vesikel zeigt eine einfache Membran, während die Abbildungen 3.37(a) bis 3.37(c) stellenweise auch die Interpretation einer Mehrfachmembran zulassen. Das Objekt auf Abbildung 3.37(c) ist zu klein für ein Vesikel ([165]) und war wahrscheinlich eine Phospholipid-Agglutination.

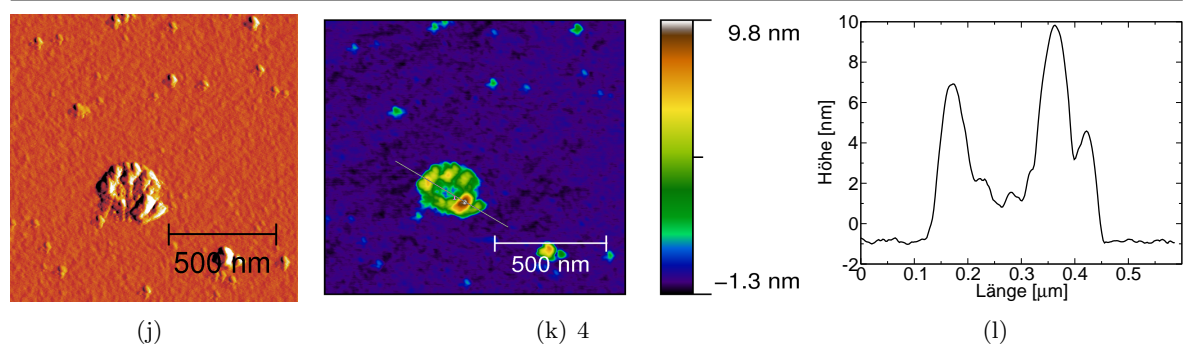
Spülen mit Chloroform Um das Innere der Vesikel frei zu legen wurde bei einigen Proben versucht, die Vesikelmembran wegzulösen, indem einige μ l Chloroform über den Si-Waver gespült wurden. Die Abbildung 3.38 zeigt dieselbe Probe vor (3.38(a)) und nach (3.38(b)) dem Spülvorgang. Auf beiden Abbildungen sind sowohl runde, unbeschädigte Vesikel als auch eingefallene Vesikel zu sehen. Nach der Spülung zeigten die Vesikel jedoch deutlich mehr Dellen und Beschädigungen auf. Einige unversehrte Vesikel waren jedoch auch noch nach der Spülung zu sehen. Dieser erstaunlich geringe Effekt der Chloroformspülung ist vermutlich auf die vorhergehende Beschichtung mit Kohlenstoff während der ersten REM-Präparation zurückzuführen (siehe Präparation 40, Zeile 13 und 14).



mit destilliertem Wasser

mit K_2HPO_4 -Lösung als Füllung

Calciumphosphat-Stammlösung als Vesikelfüllung



mit Calciumphosphat- und Phosphoserin-Lösung als Vesikelfüllung

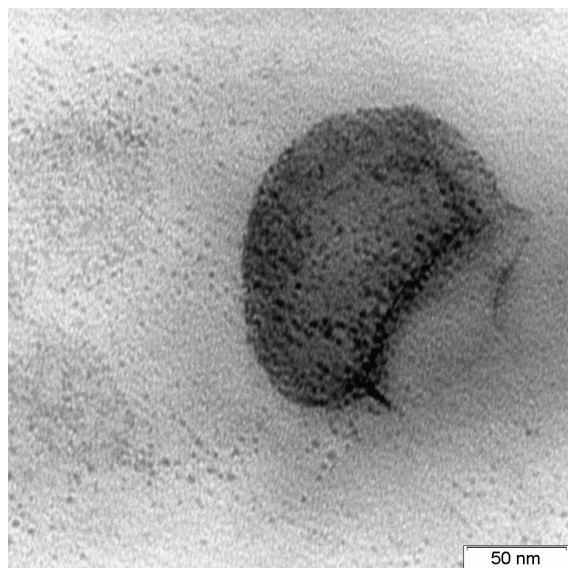
Abbildung 3.36: Vesikel aus verschiedenen Pufferlösungen im AFM

Vesikel mit Calciumphosphat und Phosphoserin-Calciumphosphat Die Abbildungen 3.39(a) und 3.39(b) zeigen Vesikel, in deren Inneren Phosphatpuffer eingeschlossen wurde. Das Phosphat der die Vesikel umgebenden Lösung wurde durch Dialyse gegen Aq. dest. entfernt, die Calciumzufuhr erfolgte durch eine zweite Dialyse gegen CaCl_2 -Lösung. Ionophoren ermöglichten dabei die Diffusion von Ca^{2+} und K^+ durch die Membran. Bei dem Vesikel auf der Abbildung 3.39(a) wurde zusätzlich Phosphoserin zum Phosphatpuffer gegeben (Präparation siehe Tabelle 2.5, Zeile 14 und 15). Bei dem Vesikel ohne Phosphoserin waren kleine plättchenförmige Kristallite sichtbar, während bei Anwesenheit von Phosphoserin eher kugelartige Formen auftreten. Obwohl die Vesikellösung vor der Dialyse durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 450 nm gepresst wurde, waren viele Vesikel deutlich größer. Die Erklärung hierfür liefern *Wilschut et al.* und *Eanes et al.*, indem sie nachwiesen, dass Vesikel in Anwesenheit von Calciumphosphat häufig verschmelzen [63, 263]. Von beiden Vesikeln wurden EDX-Spektren aufgenommen (siehe Abbildungen 4.10 und 4.11). Die Anwesenheit von Na^+ , K^+ und Cl^- zeigten, dass trotz der Dialyse noch einige Gegenionen aus der Präparation vorhanden waren und eröffnen die Möglichkeit, dass die auf den REM-Abbildungen sichtbaren Kristalle nicht nur aus Calciumphosphat, sondern auch aus diesen Elementen bestanden. Das wesentlich kleinere Löslichkeitsprodukt des Calciumphosphats legt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich um Calciumphosphatkristallite handelt.

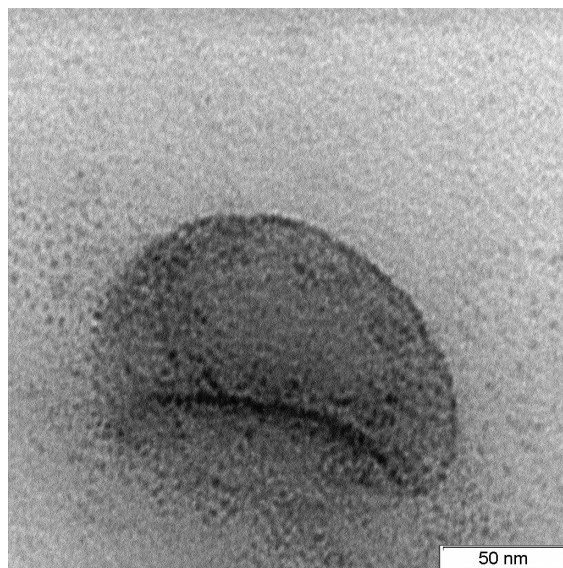
Vesikel mit und ohne Ionophoren Auf der Bildgruppe auf Seite 119 sind auf der linken Seite (Abbildungen 3.40(a) und 3.40(c)) Vesikel mit Ionophoren abgebildet und auf der rechten Seite Vesikel aus der selben Präparation, die keine Ionophoren enthielten (Abbildungen 3.40(b) und 3.40(d)). Die entscheidende Wirkung der Ionophoren wird bei der Dialyse gegen die Calciumlösung entfaltet, wenn Ca^{2+} in das Vesikel diffundieren und zum Ladungsausgleich K^+ aus dem Vesikel hinaus diffundiert. Mit Ionophoren erschienen die Vesikel glatt und gut intakt mit kleinen klar definierten Kristalliten in der Membran, während die Vesikel ohne Ionophoren faltig waren, so dass nicht immer klar war, ob in der Membran ein Kristallit oder eine Falte vorlag. Die Kristallplättchen auf Abbildung 3.40(c) (Pfeil) zeigen eine Geometrie, die gut zu einem hexagonalen (wie dem des HAp) oder trigonalen (wie dem des OCP) Kristallsystem passt.

3.6.1 Zusammenfassung und Interpretation

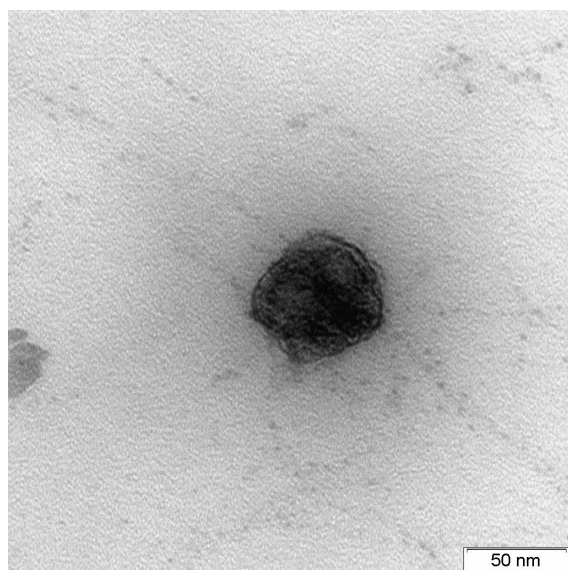
Als Modell für extrazelluläre Matrixvesikel wurden künstliche Vesikel aus Phospholipiden hergestellt, darin Calciumphosphatkristalle gezüchtet und diese im REM, im TEM und im AFM abgebildet. Die Größe der Vesikel stimmt mit den Maßen vieler Publikationen überein. So haben *Reigada et al.* einen Durchmesser von 70 - 500 nm und eine Wanddicke von 5 nm in Wasser gemessen [205] und aus der Wachstumsfuge des Knochens sind Vesikel mit 50 - 150 nm Durchmesser bekannt [122]. Die Synthese von künstlichen Vesikeln sowie deren Abbildung mit elektronenmikroskopischen und kraftmikroskopischen Methoden zeigte vor allem bei den in destilliertem Wasser hergestellten Vesikeln unterschiedliche Erscheinungsformen, da die



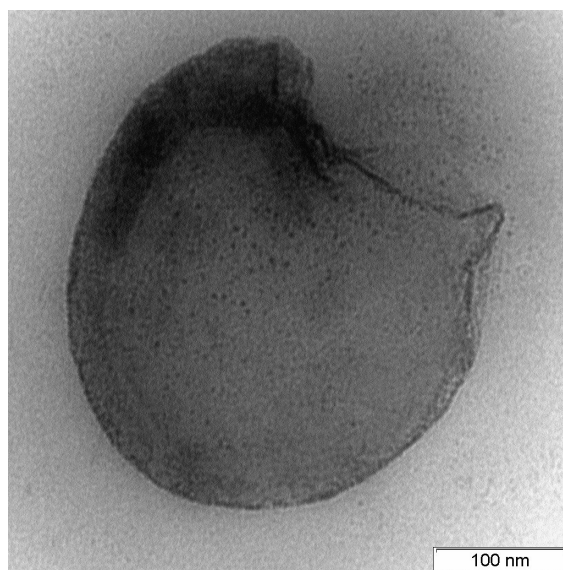
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 3.37: Vesikel im TEM, eingebettet in Epoxidharz

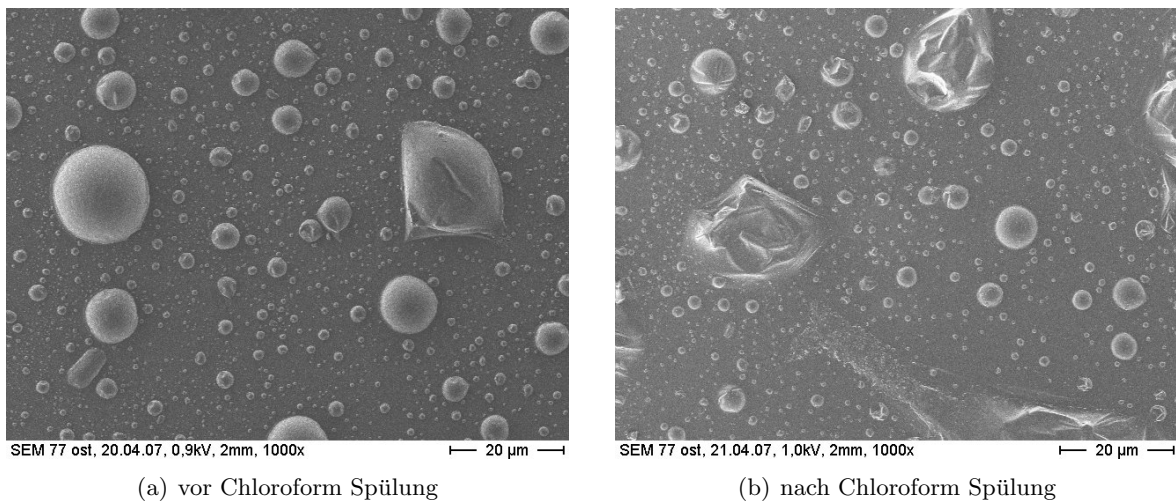


Abbildung 3.38: Die Abbildungen zeigen dieselbe Probe einmal bevor (a) und einmal nachdem (b) sie mit Chloroform gespült wurde. Präparation s. Seite 40, Zeile 13 und 14.

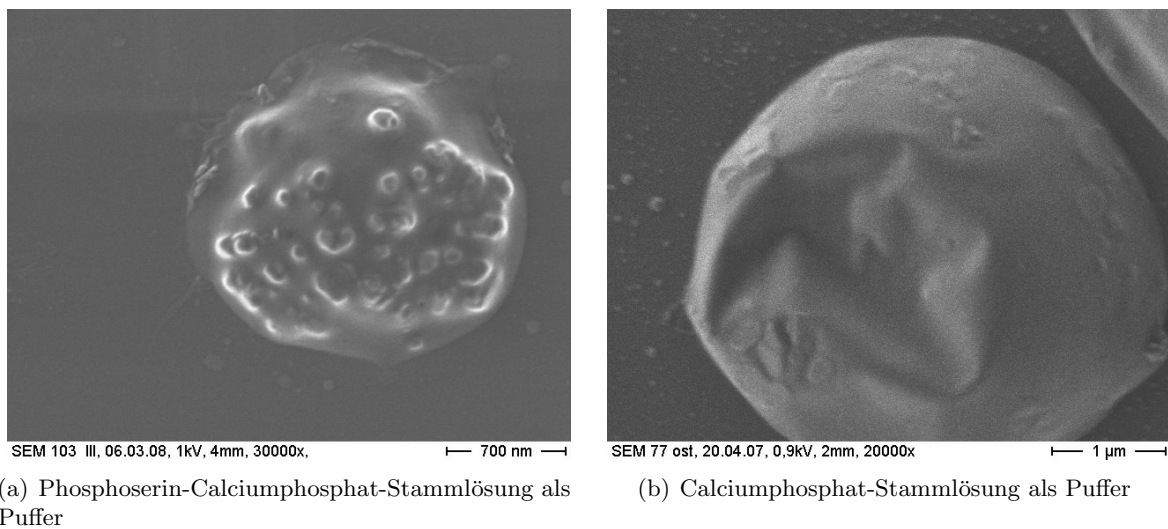
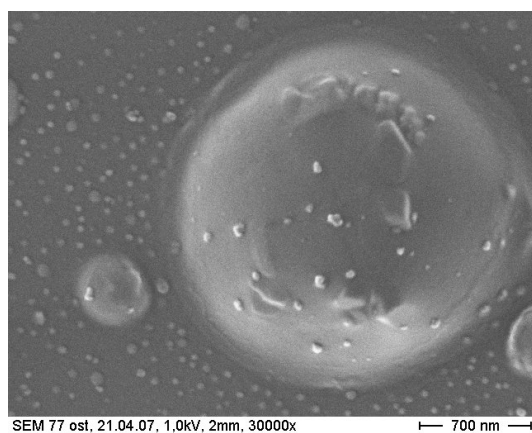
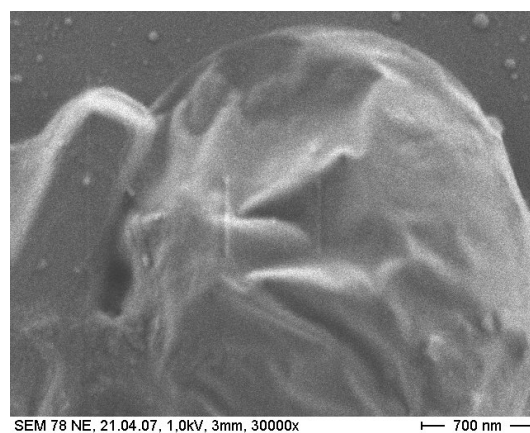


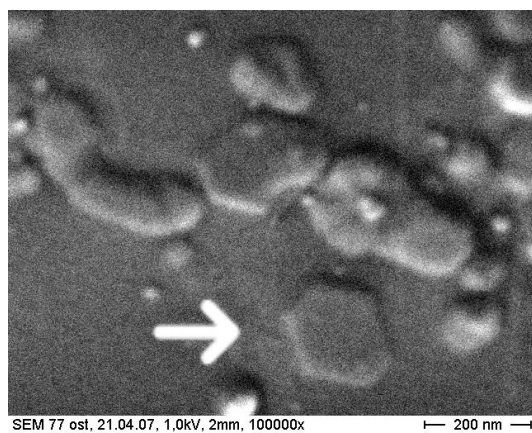
Abbildung 3.39: Wird bei der Vesikelherstellung zu der Calciumphosphat-Pufferlösung noch Phosphoserin hinzugefügt, sind statt der plättchenartigen Strukturen globuläre Objekte auf den REM-Abbildungen zu erkennen



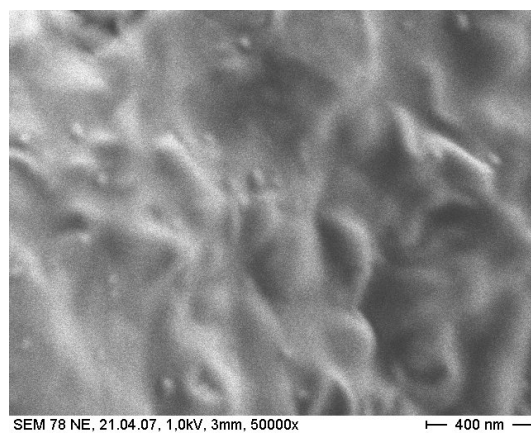
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 3.40: Vesikel mit (links) und ohne (rechts) Ionophoren

Membran offenbar nicht sehr stabil war und während der Präparation für das Messgerät auf verschiedene Weisen zerstört wurde. Vesikel aus salzhaltigen Pufferlösungen zeigten deutlich stabilere Membranen.

Es wurden erfolgreich Calciumphosphatkristallite an der Membran der Vesikel gezüchtet. Die Kristallite waren dabei gleichmäßig über das gesamte Vesikel verteilt; ein bevorzugter Mineralisationsbereich war nicht zu erkennen. Bei Zugabe von Phosphoserin entstanden kugelige Formen statt der Plättchen. Vermutlich ist die Wechselwirkung von Ca^{2+} und HPO_4^{2-} mit Phosphoserin stärker als die mit DPPC, wodurch ein globulärer, amorpher Komplex um das Phosphoserin stabiler wäre als die flächige Adsorption von Ca^{2+} an den Phosphatgruppen des DPPC.

Versuche, die Membran mit Chloroform aufzulösen und so einen Blick in das Innere der Vesikel zu erlangen, schlugen vermutlich auf Grund der Kohlenstoffbeschichtung der Proben fehl. Hier könnten Lösungsversuche im AFM bessere Erfolge bringen.

Die Calciumphosphatkristallite wuchsen direkt an der Membran. Ob sie an deren Innenseite, der Außenseite oder im Intermembranraum entstanden, kann aus den REM-Abbildungen nicht eindeutig bestimmt werden. *Eanes et al.* gibt als Wachstumsort für die Kristallite den Intermembranraum an [63].

4 Abschließende Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Vorgang der Nukleation und des ersten Mineralwachstums von Calciumphosphat an Phosphoserin, den für den Menschen besonders relevanten Proteinen (Osteocalcin, Fetuin und Kollagen) sowie in Phospholipidvesikeln näher zu verstehen. Hierfür wurden Proben nasschemisch im Labor vorbereitet und mit verschiedenen Methoden (AFM, REM, FT-IR, Massenspektroskopie, UV/vis, NMR, XRD) analysiert. Ergänzend wurden an Modellen mit wenigen Atomen Computersimulationen durchgeführt.

Calciumphosphat Die Computersimulationen zeigten die Potential- und Ladungsverteilungen an Molekülen und Komplexen. Die Ladung eines einzelnen Ca^{2+} in Wasser blieb nicht auf dieses Ion beschränkt, sondern verstreute sich teilweise auf die simulierte erste Hydrathülle. Dies fördert vermutlich die Dimerbildung, da eine negativ geladene Phosphatgruppe (z. B. HPO_4^{2-}) schon bei einem Abstand von 1-2 H_2O Molekülen in das Potentialfeld des Ca^{2+} eintritt. Ein CaHPO_4 -Dimer zeigt diese Ladungswolke praktisch nicht mehr.

Die Simulationen der IR-Spektren von $\text{H}_x\text{PO}_4^{x-3}$, CaHPO_4 und $[\text{CaHPO}_4]_2$ -Modellen zeigten, dass die Verschiebungen einzelner Banden systematisch von bestimmten Wechselwirkungen je nach Schwingungsmodus und Frequenz abhingen. Sie halfen bei der Interpretation komplexer Spektren, wie dem des Phosphoserin-Calciumphosphat-Spektrums. Das simulierte IR-Spektrum eines $[\text{CaHPO}_4]_2$ -Komplexes zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum von amorphem Calciumphosphat (ACP).

Die AFM- und REM-Abbildungen einer eingetrockneten verdünnten Calciumphosphatlösung zeigten ACP-Kugel mit 50 - 200 nm Durchmesser und einer Unterstruktur aus kleineren Kugeln (ca. 5 nm Durchmesser). Die Größe der Kugeln variierte kaum innerhalb einer Präparation.

Phosphoserin Die Computersimulation des IR-Spektrums eines $[\text{PS}_2\text{Ca}_2\text{HPO}_4]^{2+}$ Komplexes lieferte keine exakte Übereinstimmung mit den nasschemisch hergestellten Proben, aber die im Modell bei einer bestimmten Frequenz schwingenden Gruppen stimmten mit den in der Literatur angegebenen Frequenzen dieser Gruppen überein. So konnte gezeigt werden, dass Phosphoserin bei Kopräzipitation mit Calciumphosphat mit allen funktionellen Gruppen ($-\text{PO}_4^{3-}$, $-\text{NH}_3^+$ und $-\text{COO}^-$) wechselwirkte und höchstwahrscheinlich in amorphes Calciumphosphat mit eingebaut wurde. Die Computersimulation des im Vakuum geometrisch optimierten Phosphoserins zeigte ein deutliches elektrisches Potential über das gesamte Molekül; dies begünstigt die Wechselwirkung mit geladenen Ionen wie Ca^{2+} oder PO_4^{3-} . In der cis-Konformation hatten die Phosphat-, Amino- und Carboxylgruppe direkten Kontakt und könnten möglicherweise ein Proton transportieren.

Die deutliche Wechselwirkung von Phosphoserin auf die Calciumphosphatpräzipitation wurde auch mit ESI-MS-, REM- und AFM- Untersuchungen beobachtet. Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen zeigte sich, dass Phosphoserin meist als Dimer auftrat und die

Affinität von Kationen zum Phosphat des Phosphoserins größer war als zu anorganischem Phosphat (P_i) in der Lösung. Die REM- und AFM-Abbildungen zeigten, dass Serin einen sehr geringen Einfluss auf die Morphologie des Calciumphosphatniederschlags hatte, Phosphoserin hingegen verkleinerte die ACP-Kugeln deutlich. Die Phosphatgruppe bewirkte an dieser Stelle offenbar den Unterschied zwischen einer sehr leichten Wechselwirkung, vermutlich an der Oberfläche des Calciumphosphats (Serin) und einer intensiven Wechselwirkung, vermutlich sogar dem kompletten Einbau der Aminosäure in die ACP-Kugeln (Phosphoserin).

Fetuin Bei der Bildung von Calciumphosphat aus wässriger Lösung entstanden häufig ACP-Kugeln. Wurden diese eingetrocknet und war die Dichte so hoch, dass sie sich berührten, verschmolzen sie zu einer gleichmäßigen Schicht. Bei Anwesenheit von Fetuin wurde dieses Verschmelzen verhindert, die ACP-Kugeln blieben voneinander getrennt, obwohl sie sich berührten. Die Unterstruktur, die die ACP-Kugeln brombeerartig erscheinen liess, war mit und ohne Fetuin sichtbar. Dies unterstützt die Vermutung von *Heiss et al.*, dass die ACP-Kugeln von einer Schicht Fetuin eingehüllt werden [98]. Des Weiteren könnte durch diese Hülle eingeschlossenes Wasser eine Kristallisation innerhalb der Kugel verhindern.

Trotz der Eigenschaft von Fetuin, Calciumphosphat in Suspension zu stabilisieren, steigerte dessen Anwesenheit in einer Pufferlösung die Löslichkeit von Calciumphosphat nicht merklich. Versuche, Brushit mit einer Fetuinlösung aufzulösen, zeigten im Vergleich zu TRIS-Puffer oder in destilliertem Wasser keinen erkennbaren Unterschied.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Fetuin auf die Geschwindigkeit der Kollagenassemblierung mittels UV/vis Spektroskopie getestet. Hierbei zeigte auch die höchste getestete Fetuinkonzentration von 100 μg pro mg Kollagen keinen Einfluss auf die Kinetik der Assemblierung. Im AFM zeigten diese Kollagenfibrillen im Vergleich zu den ohne Fetuin assemblierten Fibrillen keine morphologischen Besonderheiten. Fetuin hatte praktisch keinen Einfluss auf die Kollagenassemblierung.

Auch die Entstehung von Hanteln wurde mit Fetuin beobachtet. Im Zusammenhang mit den vorher gesammelten Erkenntnissen und unter Einbeziehung von Literaturdaten wurde eine Arbeitshypothese erstellt, die die Entstehung der Hanteln erklärt (Siehe nächste Seite).

Osteocalcin Osteocalcin (OC) wurde mit Calciumphosphatlösung mittels ESI-MS untersucht um festzustellen, ob das Protein in der Lage ist auch Calciumphosphatkeime mit positiv und negativ geladenen Ionen zu komplexieren. Es wurden viele verschiedene Komplexe aus Ca^{2+} , Na^+ und P_i an einem Osteocalcin detektiert, der größte, gut zuzuordnende Komplex bestand aus $[\text{OC Ca}_2 (\text{PO}_4)_2 \text{Na}_4]^+$. Komplexe mit Ca^{2+} waren deutlich häufiger als Komplexe mit Na^+ . Mit wachsender Keimgröße nahm die Signalstärke ab. Dies bestätigte, dass Osteocalcin eine sehr hohe Affinität zu Ca^{2+} und über Kationen auch zu P_i komplexieren kann. Die genaue Stelle am Protein kann mit diesen Daten nicht bestimmt werden, allerdings zeigt eine Fläche des Proteins drei negativ geladene γ -carboxylierte Glutaminsäuren und zwei Asparaginsäuren; eine Akkumulation von Kationen an dieser Stelle ist somit wahrscheinlich [58, 103]. Vermutlich spielt bei der Entstehung großer Komplexe nicht nur die negative Ladung

des Biomoleküls eine Rolle, sondern auch deren geometrische Anordnung, da die negativ geladenen P_i aus dem angelagerten Komplex wahrscheinlich über die Kationen gehalten werden.

Kollagen Eine Reihe von Versuchen, assemblierte Kollagenfibrillen mit Calciumphosphat nach zu mineralisieren, wurden unter dem AFM beobachtet. Dabei legte sich meist ein gleichmäßiger Film aus amorphem Calciumphosphat um die Fibrillen. Das Auffüllen der Zwischenräume der Bänderung wurde nur einmal beobachtet. Offenbar sind für eine knochenartige Mineralisation der Kollagenfibrillen weitere Faktoren, wie funktionelle Gruppen, mechanische Belastung und Zeit nötig.

In der AFM Flüssigzelle wurde der Effekt von Phospholipidvesikeln auf Kollagenfibrillen beobachtet. Die Fibrillen wurden mit fortschreitender Inkubationszeit weicher und elastischer, verloren jedoch nicht ihre Integrität oder die Position auf dem Probenträger. Offenbar hatten die Vesikel eine aufweichende Wirkung. Dies könnte die Fähigkeit der Fibrillen, mehr Calciumphosphat aufzunehmen, verbessern und so deren Mineralisierung unterstützen.

Matrixvesikel Trotz der wichtigen Rolle die Vesikel in der Biologie spielen, gibt es in der wissenschaftlichen Literatur nur wenige REM und AFM-Abbildungen dieser Objekte. Die Darstellungen von Vesikeln mit diesen Mikroskopen zeigten viele Details der Vesikeloberflächen, die bei der Abbildung durch ein TEM verborgen bleiben. In dieser Arbeit wurden Vesikel aus DPPC in Wasser und in verschiedenen Pufferlösungen hergestellt. Die verschiedenen Salze in den Pufferlösungen führten zu unterschiedlichen Erscheinungsformen der Vesikel, da wahrscheinlich die verschiedenen Salze die Membran unterschiedlich stark stabilisierten.

Mit Hilfe von Ionophoren konnten Kristallite an der Vesikelwand gezüchtet werden, die höchstwahrscheinlich aus Calciumphosphat bestanden. Auch *Eanes et al.* konnten Kristallite an der Innenseite einer Vesikelmembran beobachten [60]. Wurde zusätzlich Phosphoserin in die Vesikel eingeschlossen, wurden statt symmetrischer Plättchen globuläre Objekte in der Vesikelwand gefunden.

Arbeitshypothese Die Hypothese besagt, dass eine positiv geladene Hydrathülle mit einem hohen Anteil an Hydroniumionen mit Protonen aus dem Reifevorgang des Calciumphosphatkeims in die Hydrathülle übernommen werden und so die zufällige Anlagerung weiterer Ionen unterbindet.

Im Falle der ACP-Kugeln ist diese Schicht gleichmäßig um einen wachsenden Calciumphosphatkeim verteilt. Mit wachsender Größe der Kugel stehen mehr Protonen zur Verfügung und die Potentialschicht wird so stark, dass die Anlagerung weiterer Ionen behindert wird. Dies erklärt die homogene Größenverteilung der ACP-Kugeln innerhalb einer Präparation.

Im Falle der Hanteln bildet sich die Potentialschicht um einen stäbchenförmigen Kristallkeim. Der schwächste Punkt der Potentialschicht ist an den Enden, hier können Ionen eindringen und sich an den Kristallit anlagern. Dies führt zu einem Auffächern des Keims und

hantelförmige Strukturen entstehen (Ausführliche Beschreibung in Abschnitt 3.3.3, Seite 98).

Schlussfolgerung Bei der homogenen Calciumphosphatnukleation stabilisieren vermutlich zwei oder mehr Kationen einen Ionenkomplex mit einem Phosphat, das Ca/P Verhältnis wäre dann schon mit dem ersten Keim grösser eins. Wird die Nukleation durch eines der hier untersuchten Biomoleküle gefördert (heterogene Nukleation), unterstützen negative Ladungen der funktionellen Gruppen die Akkumulation mehrerer Kationen und ermöglichen so die Anlagerung von Phosphationen.

Interessanter Weise zeigen die Carboxylgruppen des Osteocalcins sehr gute Wirkung bei der Komplexbildung von Ca^{2+} , während die Carboxylgruppe des Serins nicht ausreicht, um die Calciumphosphatpräzipitation deutlich zu beeinflussen. Diese feinen Energieunterschiede, machen die Vorhersage der präzipitierenden Calciumphosphat-Phase und deren Morphologie sehr schwierig, ermöglichen aber trotz konstantem pH und Osmolarität im Organismus die mineralische Phase auf- ab- und umzubauen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Nukleation über eine amorphe Phase¹ erfolgt, die sich unter Abspaltung von Protonen stabilisiert. Diese Protonen bauen vermutlich, wenn genügend Material vorhanden ist, eine Potenzialschicht auf, die die Kristallmorphologie lenken kann. Für das Verständnis der Wechselwirkung von organischen Molekülen mit Calciumphosphat muss somit das Verhalten des Biomoleküls bei einem kurzzeitigen Protonenanstieg beachtet werden.

Auch der Austausch von Wassermolekülen zwischen dem Mineralkeim, den Biomolekülen und der Lösung haben aus diesem Grund einen starken Einfluss auf das Wachstum der mineralischen Phase und sollten bei der Erforschung der Calciumphosphat-Biomineralisation mit beachtet werden. Möglicherweise liegt der Wirkungsmechanismus von Fetuin genau im Verhindern dieses Austauschs.

Ausblick Generell ist weitere Grundlagenforschung über das Verhalten von Calciumphosphat in wässriger Lösung wünschenswert, da dieses Mineral im Stoffwechsel des Menschen eine wichtige Rolle spielt und viele damit assoziierte Krankheiten bisher nur unbefriedigend behandelt werden können. Kleine Veränderungen in der Präparation führen oft zu deutlich unterschiedlichen Kristalliten, wobei die genauen chemisch-physikalischen Zusammenhänge häufig unklar bleiben.

Eine genaue Quantifizierung der Bindungsenergien ist nötig, um die Ergebnisse der Experimente besser theoretisch zu erklären. Ein Computermodell, das sowohl die Bindungsenergien eines wachsenden Calciumphosphatkeims über den kritischen Nukleationsradius hinaus, als auch den lösenden Einfluss des Wassers genau quantifiziert, ist die Grundlage, um den Einfluss von Ionen und Biomolekülen zu verstehen.

¹ wächst als erster Niederschlag schon ein Kristall, so kann der Ionenkomplex, der weniger als eine Einheitszelle an Material enthält auch als amorphe Phase bezeichnet werden

Spezielle Untersuchungen zur Validierung der Arbeitshypothese sollten durchgeführt werden. Hierfür könnte der Calciumphosphatlösung ein pH-empfindlicher Farbstoff zugegeben werden und in einer 1-5 μm dicken Kammer der pH-Wert ortsabhängig mikroskopisch untersucht werden, um die Existenz und Stärke einer Potenzialschicht nachzuweisen [132]. Vor allem die Frage, unter welchen Bedingungen sie wirksam ist, sollte geklärt werden.

Die Vorgabe einer Gitterrichtung durch Biomoleküle kann besonders gut mit Osteocalcin untersucht werden, da dies ein starker Mineralisationskeim ist und das Calciumphosphat sehr deutlich in eine Plättchenform zwingt [71]. Wie die Biomoleküle die Kristallachsen vorgeben, ist vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass in wässriger Lösung meist ein großer amorpher Mineralkomplex einem Kristallit vorläuft, noch unklar. Über den Mechanismus der Richtungsvorgabe gibt es wenig Untersuchungen und eine Reihe interessanter Fragen sind offen: Ab welcher Keimgröße ist ein Kristallgitter zu erkennen? Wie viele Proteine sind nötig, um das Calciumphosphat in eine Plättchenform zu zwingen? Gelingt es, mit Hilfe von Proteinen die Kristallite nach Wunsch zu formen, sind eine Vielzahl von Anwendungen vorstellbar.

Folgende fiktive Anwendungsszenarien sollen Anstoß für weitere Ideen sein:

(1) Ein Templat, entwickelt nach der Wirkungsweise von Osteocalcin, wird einer Calciumphosphatlösung zugegeben, so dass viele gleichmäßige Kristallplättchen entstehen. Diese werden auf einen Kollagenfilm gegeben, der die Plättchen auf Grund der Wechselwirkung zum Templat fest bindet. Wechsellagen von Kollagen und Calciumphosphatplättchen schaffen ein widerstandsfähiges, perlmuttartiges Kompositmaterial.

(2) Vesikel werden mit Membranproteinen versehen, die auf Grund des eingebauten Phosphoserins sehr gut mit Calciumphosphat wechselwirken. Die Vesikel adsorbieren an Calciumphosphatablagerungen und nehmen dieses Mineral über Ionenkanäle auf. Die Vesikel halten es im Inneren mit Fetuin komplexiert. Ist das Calciumphosphat abgebaut, lösen sich die Vesikel und werden verstoffwechselt.

Anhang

Erläuterungen zu den Ergebnissen

Eigenschaften ausgewählter Calciumphosphatphasen	128
Molekularmodellung: Vergleich errechneter Werte mit Literaturdaten	129
Molekularmodellung: Bindungsenergien, Atomladungen und Atomabstände	137
Phosphoserin und Serin im Vergleich (FT-IR)	138
Terminologie zur Beschreibung von IR-Spektren	139
Serin und Phosphoserin mit und ohne Calciumphosphat (Wertetabelle FT-IR)	140
Serin und Phosphoserin mit und ohne Salze (ESI-MS)	161
Osteocalcin - Aminosäuresequenz	168
Fetuin - Einfluss auf Tapes und die synchrone Mineralisierung von Kollagen (REM)	169
Phospholipid - nicht als Vesikel (AFM und REM)	171
EDX Spektren von Vesikeln	172
Glossar	174
Abbildungsverzeichnis	189
Tabellenverzeichnis	190
Literaturverzeichnis	192
Versicherung an Eides statt, Danksagung	216
Publikationen	218
Index	219

Erläuterungen zu den Ergebnissen

Eigenschaften ausgewählter Calciumphosphatphasen

Tabelle 4.1: Gleichgewichtskonstanten zu Calciumphosphat

Ca^{2+}	$+ H_2PO_4^-$	$\leftrightarrow CaH_2PO_4^+$	31,9	$l\ mol^{-1}$
Ca^{2+}	$+ HPO_4^{2-}$	$\leftrightarrow CaHPO_4$	681	$l\ mol^{-1}$
Ca^{2+}	$+ PO_4^{3-}$	$\leftrightarrow CaPO_4^-$	$2,9 \times 10^6$	$l\ mol^{-1}$
H^+	$+ H_2PO_4^-$	$\leftrightarrow H_3PO_4$	164,1	$l\ mol^{-1}$
H^+	$+ HPO_4^{2-}$	$\leftrightarrow H_2PO_4^-$	$1,58 \times 10^7$	$l\ mol^{-1}$
H^+	$+ PO_4^{3-}$	$\leftrightarrow HPO_4^{2-}$	$2,33 \times 10^{12}$	$l\ mol^{-1}$
Ca^{2+}	$+ OH^-$	$\leftrightarrow CaOH^+$	32,4	$l\ mol^{-1}$

Tabelle 4.2: Dissotiationsenergien für $CaHPO_4$ und $CaH_2PO_4^+$ [239]

	δH [kJ mol ⁻¹]	δS [J deg. ⁻¹ mol ⁻¹]
$CaHPO_4 (s) = Ca^{2+} + HPO_4^{2-}$	$-17,2 \pm 1,3$	190 ± 1
$Ca^{2+} + HPO_4^{2-} = CaHPO_4$	14 ± 8	96 ± 29
$Ca^{2+} + H_2PO_4^- = CaH_2PO_4^+$	15 ± 6	67 ± 21

Tabelle 4.3: Löslichkeitsprodukte von $CaHPO_4$ bei verschiedenen Temperaturen [239]
für $CaHPO_4$

Löslichkeitsprodukt	Assoziationskonstanten (Ac)	Ac für $CaH_2PO_4^+$
(5°C)	$2,4 \pm 0,3 \times 10^2$	5 ± 1
(15°C)	$1,9 \pm 0,2 \times 10^2$	10 ± 1
(25°C)	$3,8 \pm 0,5 \times 10^2$	10 ± 1
(37°C)	$3,9 \pm 0,9 \times 10^2$	11 ± 1

Tabelle 4.4: Typische Winkel in Brushitkristallen nach *LeGeros und LeGeros* [148]

Einschließende Flächen	Winkel
[001] [101]	33° 05'
[101] [100]	30° 30'
[100] [20 $\bar{1}$]	27° 45'
[20 $\bar{1}$] [10 $\bar{1}$]	27° 11'
[10 $\bar{1}$] [10 $\bar{2}$]	29° 12'
[10 $\bar{2}$] [00 $\bar{1}$]	32° 16'

Tabelle 4.5: Löslichkeitsprodukt verschiedener Calciumphosphatphasen bei 37°C [24]

Brushit	$10^{-6.622}$
OCP	$10^{-12.10}$
HAp	$10^{-7.50}$

Molekular Modelling

Tabelle 4.6: Molekularmodellierung: Vergleich errechneter Werte mit Literaturdaten. V = Vakuum;
L = Lösung.

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
H ₂ O			
O-H Abstand bei einem H ₂ O in Vakuum	[Å]	0,989	O-H bei einem H ₂ O, <i>ab initio</i> mit 6-31G(d,p) Basisset und Korrelationsenergie [155]
		0,965	O-H H ₂ O Dimer, verschiedene DFT Methoden mit Korrelationsenergie [229]
H-O-H Winkel, monomer	[Grad]	105,0	H-O-H monomer <i>ab initio</i> mit 6-31G(d,p) Basisset und Korrelationsenergie [155]
$\Delta E_{B. ges}$ von 2 H ₂ O	[kcal/mol] [kJ/mol]	-5,5 bis -7,5 -23 bis -31	ΔE von 2 H ₂ O, <i>ab initio</i> mit 6-31G(d,p) Basisset und B3LYP Korrelationsenergie [155]
		-13 -3,1	ΔE von 2 H ₂ O, verschiedene DFT Methoden mit Korrelationsenergie [229]
		-37 bis -12 -8,8 bis -2,9	H ₂ O Dimer H-Bindung, Experimentell: -22 kJ/mol (-5,3 kcal/mol) [229]
$\Delta E_{B. ges}$ 15 H ₂ O	[kcal/mol] [kJ/mol]	-102,67 bis -223,81 -429,6 bis -933,7	15 H ₂ O, HF/6-31 mit und ohne B3LYP Korrelationsenergie [155]
Fortsetzung nächste Seite ...			

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
ΔE_B , \emptyset 15 H ₂ O	[kcal/mol] [kJ/mol]	-24 -100,5	ΔE_B , \emptyset 15 H ₂ O, (HF) und DFT Methoden mit 6-31 Basiset mit und ohne Korrelationsenergie [155]
O-O bei 2. H ₂ O	[Å]	2,739	O-O bei 2 H ₂ O, verschiedene DFT Methoden mit Korrelationsenergie; experimentell: 2,98 Å [229]
O-O bei 15 H ₂ O	[Å]	2,32-2,52	O-O bei 15 H ₂ O, Durchschnittswerte (Streuung \pm 0,1) für (DFT) und HF, 6-31G(d,p) Basiset mit Korrelationsenergie [155]
Ca ²⁺ + H ₂ O			
Ca - O max + 1 H ₂ O	[Å]	2,35	Ca + 1 H ₂ O DFT Methoden, basierend auf 6-311G** Basiset [9]
Ca - O max + 2 H ₂ O	[Å]	2,35	Ca + 2 H ₂ O [9]
Ca - O max + 3 H ₂ O	[Å]	2,37	Ca + 3 H ₂ O [9]
Ca - O max + 4 H ₂ O	[Å]	2,39	Ca + 4 H ₂ O [9]
Ca - O max + 5 H ₂ O	[Å]	2,36	Ca + 5 H ₂ O [9]
Ca - O max + 6 H ₂ O	[Å]	2,37	Ca + 6 H ₂ O [9]
Ca - O max + 7 H ₂ O	[Å]	2,47	Ca + 7 H ₂ O [9]
Ca - O max + 8 H ₂ O	[Å]	2,62	Ca + 8 H ₂ O [9]
r _{Ca-O} 1.Schale	[Å]	2,2-2,65	r _{Ca-O} 1.Schale [41]
		2,45-2,5	\emptyset innere Schale r _{Ca-O} [72, 9, 220, 187]
		2,46	Ca-O(H ₂) Wert aus experimentellen EXAFS und LAXS Messungen [121]
Fortsetzung nächste Seite ...			

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
Ca - O max + 14 H ₂ O	[Å] 4,24	4,7 [Å]	Ø zweite Schale r _{Ca-O} [72, 187]
r _{Ca-O} 2.Schale	[Å] 3,2-4,5	4,7 [Å]	r _{Ca-O} 2.Schale [41] ⁺ Ca ²⁺ - H ₂ O
Ca ²⁺ + 1 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -84,759	-57,058 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 1 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] -354,873	-238,9 [kJ/mol]	
Ca ²⁺ + 2 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -165,122	-104,949 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 2 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] -691,3	-439,4 [kJ/mol]	
Ca ²⁺ + 3 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -235,136	-149,945 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 3 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] -984,467	-627,79 [kJ/mol]	
Ca ²⁺ + 4 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -298,402	-186,037 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 4 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] -1249,3	-778,90 [kJ/mol]	
Ca ²⁺ + 5 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -354,469	-212,425 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 5 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] 1483,8	-889,4 [kJ/mol]	
Ca ²⁺ + 6 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -406,830	-237,083 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 6 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] -1703,3	-992,62 [kJ/mol]	
Ca ²⁺ + 7 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -442,798	-250,253 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 7 H ₂ O E _{B, ges} [9]
	[kJ/mol] -1853,9	-1047,76 [kJ/mol]	
		-265,038 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 7 H ₂ O E _{B, ges} 6+1
		-1109,66 [kJ/mol]	[9]
Ca ²⁺ + 8 H ₂ O E _{B, ges}	[kcal/mol] -477,125	-263,191 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 8 H ₂ O E _{B, ges}
	[kJ/mol] -1997,6	-1101,93 [kJ/mol]	[9]
		-282,9 [kcal/mol]	Ca ²⁺ + 8 H ₂ O E _{B, ges} 6+2
		-1184,68 [kJ/mol]	[9]

Fortsetzung nächste Seite ...

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
		Phosphat + H ₂ O	
		1,567-1,705 [Å]	P-O in PO ₄ ³⁻ , mit verschiedenen <i>ab initio</i> Methoden mit 1-2 H ₂ O, experimentell: 1,55 Å, bei PO ₄ ³⁻ ... H ₂ O wird H leicht in die Mitte geschoben [67]
P-O(H) in HPO ₄ ²⁻ Vakuum	[Å]		
	1,805		
P-O in HPO ₄ ²⁻ Vakuum	[Å]	1,51-1,57 [Å]	P-O in HAp [49]
	1,63		
P-O(H) HPO ₄ ²⁻ mit 14 H ₂ O	[Å]	1,8 [Å]	P-O[H] HPO ₄ ²⁻ in Lösung, 6-311** Basiset, MP2 Korrelation [271]
	1,635		
H-O(P) in HPO ₄ ²⁻ Vakuum	[Å]	0,95 [Å]	O-H in HPO ₄ ²⁻ [271]
	1,001		
H-O(P) in HPO ₄ ²⁻ in H ₂ O,	[Å]		
	0,94		
O-O HPO ₄ ²⁻ mit 1 H ₂ O,	[Å]	1,5 [Å]	O-H in PO ₄ ³⁻ -H ₂ O in hydriertem Apatit [272]
	2,358		
P-O(H) in H ₂ PO ₄ ⁻ Vakuum	[Å]		
	1,713		
P-O in H ₂ PO ₄ ⁻ Vakuum	[Å]		
	1,589		
P-O(H) in H ₂ PO ₄ ⁻ 14 H ₂ O	[Å]		
	1,615-1,65		
(P)O-H (in 14 H ₂ O)H ₂ O	[Å]		
	0,96		
O-O H ₂ PO ₄ ⁻ min mit 14 H ₂ O,	[Å]		
	2,409		
		2,8 [Å]	O(H ₂ O)-O(PO ₄ ³⁻) aus Monomethyl-phosphatester <i>ab initio</i> mit HF/6-31+G** Basiset [268]
			O(H ₂ O)-O(PO ₄ ³⁻) aus Monomethyl-Phosphatester [268]
		2,8 [Å]	
			Fortsetzung nächste Seite ...

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
		1,656-1,990 [Å]	H-O in $\text{H}_2\text{O}-\text{PO}_4^{3-}$ aus Monomethyl-Phosphatester [268]
P in PO_4^{3-}	[eV]	2,585 [eV]	P in PO_4^{3-} [67]
O in PO_4^{3-}	[eV]	-1,396 [eV]	O in PO_4^{3-} partial charges= Ow -1,435 Hw (center)= +0,7175 [67]
		-1,435 [eV]	O in H_2O [67]
		+0,718 [eV]	H zwischen PO_4^{3-} und H_2O [67]
O in $\text{HPO}_4^{2-} + 1 \text{ H}_2\text{O}$, dabei sind die O ohne H negativer	[eV]	-1,435 [eV]	O in Wasser, an PO_4^{3-} adsorbiert [67]
P in HPO_4^{2-} , + 1 H_2O	[eV]	1,801 [eV]	Ladung in HPO_4^{2-} : 1,801 P [67]
P in H_2PO_4^- , Vakuum	[eV]		
O in H_2PO_4^- , Vakuum	[eV]	1,460 -0,615 [eV]	H_2PO_4^- : 1,460 -0,615 [67]
(P)O(H) in H_2PO_4^- Vakuum	[eV]	+2,18 [eV]	P in HPO_4^{2-} [271]
H in H_2PO_4^- Vakuum	[eV]	-1,09 [eV]	(P)O(H) in HPO_4^{2-} [271]
		-1,18 [eV]	O in HPO_4^{2-} [271]
		+0,45 [eV]	H in HPO_4^{2-} [271]
1. H_2O an H_2PO_4^-	[kcal/mol] [kJ/mol]	54,4 bis 58,6 [kJ/mol] 13 – 14 [kcal/mol]	Hydrationsenergie von H_2PO_4^- , 1. H_2O <i>ab initio</i> mit 6-311 Basisset und B3LYP Korrelation [211]
2. H_2O an H_2PO_4^-	[kcal/mol] [kJ/mol]	46,1 bis 50,2 [kJ/mol] 11 – 12 [kcal/mol]	Hydrationsenergie H_2PO_4^- 2. H_2PO_4^- <i>ab initio</i> mit 6-311 Basisset B3LYP Korrelation [211]
3. H_2O an H_2PO_4^-	[kcal/mol] [kJ/mol]	37,3 [kJ/mol] 9 – 12 [kcal/mol]	Hydrationsenergie H_2PO_4^- 3. H_2O <i>ab initio</i> mit 6- 311 B3LYP Korrelation [211]

Fortsetzung nächste Seite ...

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
		2,05-2,10 [Å]	(H ₂ O ₃ P)O-H(O-H) 1. H ₂ O <i>ab initio</i> mit 6-311 Basisset und B3LYP-Korrelation [211]
		-3,8 [kcal/mol]	Wechselwirkung E [kcal/mol]: 1 H ₂ O: -3,8;
		15,9 [kJ/mol]	4 H ₂ O: -31,1; [268]
		1,68 [Å]	(H ₂ O ₃ P)O-H(O-H) 2. H ₂ O <i>ab initio</i> mit 6-311 Basisset und B3LYP-Korrelation [211]
		0,130 [eV]	1. Hydrathülle (8 H ₂ O) [268]
		1,3 [Å]	Abstand für Protonenübergang von H ₃ O ⁺ zu Keton (C=O) [273]
Ca ²⁺ + Phosphat			
Ca-P in Ca ²⁺ -HPO ₄ ²⁻ , Vak.	2,65 [Å]		
Ca-O in Ca ²⁺ -HPO ₄ ²⁻ , Vak.	2,27 [Å]	2,4 [Å]	in Lösung HPO ₄ ²⁻ - Ca ²⁺ ; Ca-O [271]
P-O(H) in HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺ , Lsg	1,53 [Å]		
(P)O-H in HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺ , Vak.	0,98 [Å]		
(P)O-H in [HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺] x2 Lsg.	0,95 [Å]		
P-O in HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺ , Vak.	1,64 [Å]		
P-O in HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺ , Lsg	1,629 [Å]		
P-O in [HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺] x2 Lsg.	1,46 [Å]		
Ca-P in HPO ₄ ²⁻ -Ca ²⁺ , Vak.	2,5 [Å]		

Fortsetzung nächste Seite ...

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
Ca-P in $[\text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+}] \times 2$ mit 14 H_2O	[Å]	3,1	in Lösung $\text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+}$; Ca-P [271]
Ca - O(PO_3) $\text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+} \times 2$ mit 14 H_2O	[Å]	1,7	
P(PO_4^{3-})	[eV]	+0,52	
O(HPO_4^{2-})	[eV]	-0,88	* O mit H Zahn <i>et al.</i> : 6-311** Basisset, MP2 Korrelation [271]
H(HPO_4^{2-})	[eV]	+0,02	H(HPO_4^{2-}) [271]
P(HPO_4^{2-})	[eV]	+0,85	P(HPO_4^{2-}) [271]
O*(HPO_4^{2-})	[eV]	-0,53	O*(HPO_4^{2-}) [271]
O(HPO_4^{2-})	[eV]	-0,78	O(HPO_4^{2-}) [271]
$\text{HPO}_4^{2-} - \text{H}_2\text{O}$	[Å]	1,2-1,65	
Ca-Ca in $\text{Ca}^{2+} - \text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+}$, Vak.	[Å]	5,95	$[\text{Ca}^{2+} - (\text{HPO}_4^{2-}) - \text{Ca}^{2+}]^{2+}$ Ca - Ca [271]
Ca-Ca in $\text{Ca}^{2+} - \text{HPO}_4^{2-} - \text{Ca}^{2+}$, mit 9 H_2O	[Å]	6,05	
		2,6-2,5	Ca-O, Ca1 und Ca2 [271]
		27	[kJ/mol] Energie, um ein H von HPO_4^{2-} bei Anwesenheit eines Ca^{2+} abzuspalten [271]
		120	[Grad] Ca-O-P [271]
Fortsetzung nächste Seite ...			

Kontext in dieser Arbeit	Wert	Wert	Kontext in der Literatur
		7,4 31	Energiebarriere der Deprotonierung des P_i mit 2 Ca^{2+} [271]
		80 – 120 335 – 502	Energieunterschiede zwischen verschiedenen Geometrien von $Ca_3(PO_4)_2$ Komplexen, errechnet mit <i>ab initio</i> Methoden (restricted HF mit B3LYP-Korrelation) [252, 126]
		150 628	Energieunterschiede zwischen verschiedenen Geometrien von $Ca_9(PO_4)_6$ Komplexen (Posner Komplex), errechnet mit <i>ab initio</i> Methoden (restricted HF mit B3LYP-Korrelation) [252, 126]

Tabelle 4.7: Bindungsdaten zu Abbildung 3.1 (Seite 46). E_{B, H_2O} : Energie eines adsorbierten H_2O in [kJ/mol]; Ob. [\AA^2]: v. d. W. Oberfläche, siehe Oberfläche eines Moleküls; Q [eV]: Mulliken Ladung, entweder des (Ca)-Atoms, oder (ΣO_{P_i}) der Summe der O Mulliken-Ladungen von P_i ; $E_{B, \emptyset}$: Durchschnittl. Adsorptionsstärke der Wassermoleküle in [kJ/mol]; B. [n]: Anzahl der Bindungen; Ca - P [\AA]: Abstand Ca - P (des P_i)

Adsorb. $H_2O \downarrow$	H_2O			Ca^{2+}			HPO_4^{2-}			H_3PO_4			$CaHPO_4$		
	E_{B, H_2O}	Ob. [\AA^2]	B. [n]	E_{B, H_2O}	Q (Ca)	B. [n]	E_{B, H_2O}	$Q \Sigma O_P$	B. [n]	E_{B, H_2O}	$Q \Sigma O_P$	B. [n]	E_{B, H_2O}	Q (Ca)	$Q (\Sigma O_P)$
0	$E_{B, \emptyset}$			$E_{B, \emptyset}$			$E_{B, \emptyset}$			$E_{B, \emptyset}$			$E_{B, \emptyset}$		
		117,01												0,99	-2,19 2,65
1	-29,37	170,68	1	-354,63	1,77		-296,68	-2,16		-180,98			-292,42	0,98	-2,18
	-29,37		1	-354,63		1	-296,68		1	-90,49		2	-292,42		2,71
2	-80,01	216,36	3	-336,24	1,56		-231,72	-2,64		-172,79			-186,51	0,85	-2,18
	-36,46		3	-345,43		2	-264,20		2	-88,44		4	-159,64		2,71
3	-157,37	226,68	4	-292,94	1,4		-190,12	-2,5		-85,54			-191,72	0,9	-2,2
	-66,69		4	-327,94		3	-239,51		3	-87,86		5	-167,66		2,78
4	-88,42	259,40	5	-264,71	1,27		-164,12	-2,41		-93,46			-184,44	0,89	-2,22
	-71,03		5	-312,13		4	-220,66		4	-76,11		7	-142,52		2,89
5	-93,82	277,32	7	-234,58	1,17		-146,44	-2,37		-68,17			-133,55	0,87	-2,22
	-64,14		7	-296,62		5	-205,82		5	-75,12		8	-123,58		2,78
6	-120,48	297	7	-219,08	1,08		-178,92	-2,32		-92,37			-161,79	0,86	-2,21
	-81,35		7	-283,70		6	-172,57		7	-69,33		10	-104,59		2,84
7	-130,33	299,35	12	-150,49	1,04		-134,32	-2,34		-58,68			-107,23	0,84	-2,21
	-58,32		12	-264,67		7	-167,79		8	-68,36		11	-104,81		2,71
8	-125,68	326,54	13	-143,62	1		-95,30	-2,32		-119,14			-156,26	0,86	-2,21
	-63,50		13	-249,54		8	-159,74		9	-72,59		12	-100,99		2,94
9	-116,78	355,50	14	-103,15	0,97		-97,45	-2,25					-53,58	0,88	-2,22
	-67,30		14	-233,27		9	-139,55		11				-97,83		2,97
10	-125,40	367,04	16	-140,31	0,95		-101,00	-2,26					-175,48	0,84	-2,22
	-66,73		16	-240,49		11	-136,34		12				-102,69		2,98
11	-59,43	404,68	16	-94,54	0,93		-90,42	-2,27					-62,50	0,84	-2,23
	-70,44		16	-251,00		11	-115,10		15				-100,32		2,95
12	-160,84	417,93	16	-125,78	0,91		-186,38	-2,27					-94,44	0,82	-2,23
	-80,50		16	-229,27		14	-119,55		16				-100,00		2,99
13	-115,44	450,51	19	-109,23	0,91		-136,81	-2,28						0,83	-2,14
	-73,86		19	-231,83		16	-102,48		20					19	3,08
14	-99,12	461,56	21	-98,82	0,89		-130,01	-2,31						0,82	-2,14
	-71,55		21	-233,34		18	-94,77		23						3,08
20														0,8	-2,27 3,13

Phosphoserin und Serin in der FT-IR

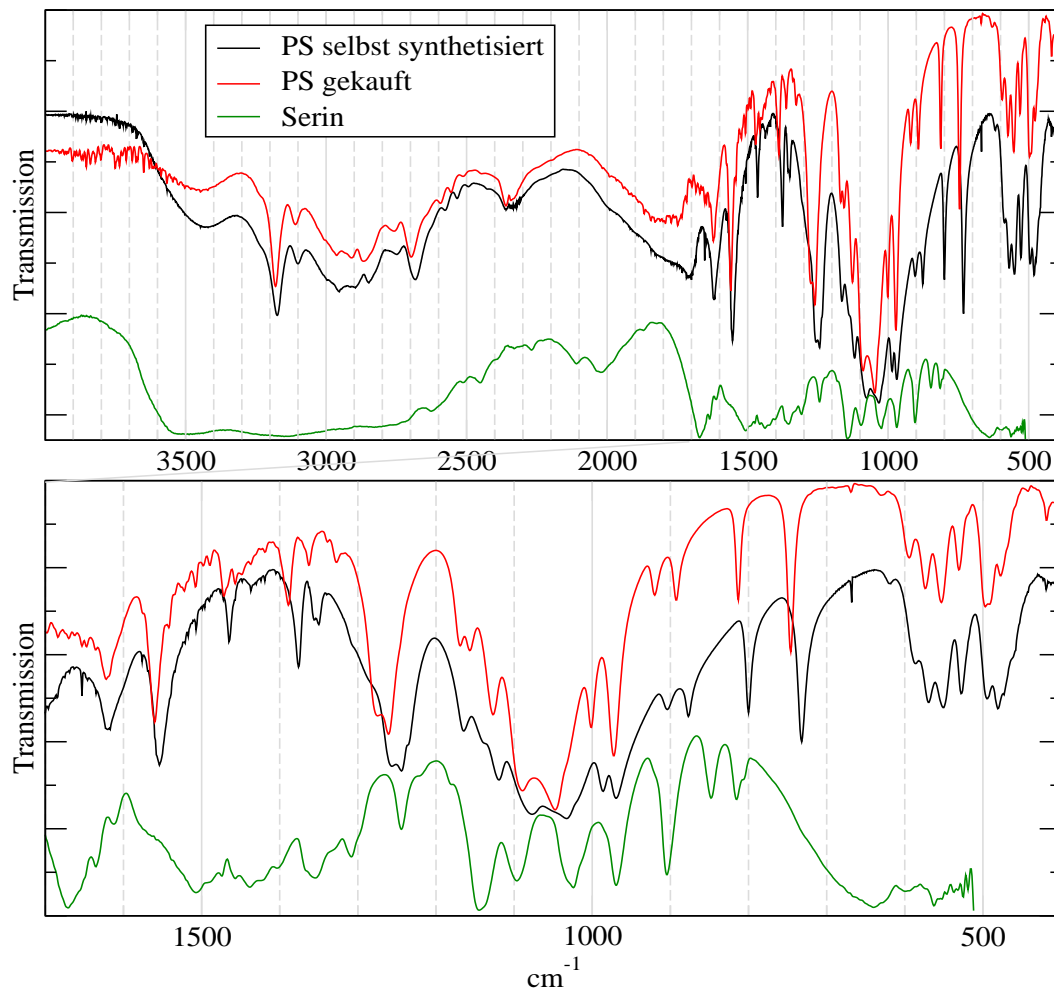


Abbildung 4.1: Der Vergleich der IR-Spektren des selbst synthetisierten mit dem gekauften Phosphoserin. Die Spektren des gekauften und des selbst phosphorylierten Phosphoserins sind fast identisch. Der einzige nennenswerte Unterschied besteht in einer Verschiebung des Spektrums des selbst phosphorylierten Phosphoserins zu 3-20 cm^{-1} kleineren Wellenzahlen. Eine solche Verschiebung kann durch starke H-Brücken zustande kommen. Makroskopisch unterschieden sich die beiden Pulver dadurch, dass die selbst phosphorylierte Aminosäure etwas gelblicher erscheint, sich aus größeren Kristalliten zusammensetzt und einen härteren Eindruck macht. Wahrscheinlich ist der, für die Reinigung nötige, langsame Lösungs- und Wiederausfällungsprozess der Aminosäure (siehe Abschnitt 2.2.4, Präparationsschritt 6 und 7) die Ursache für die, im Vergleich zu dem gekauften Phosphoserin, großen Kristallite.

Terminologie IR

Hat die Schwingung eines atomaren Systems auch eine periodische Änderung des Dipols zur Folge, ist diese Schwingung Infrarot aktiv. Meist wird statt der Frequenz die Wellenzahl angegeben:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (4.1)$$

Hierbei sind $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl, ν die Frequenz, c die Lichtgeschwindigkeit ($3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$) und λ die Frequenz. Bei drei oder mehr involvierten Atomen kann die Schwingung symmetrisch (ν_s) oder asymmetrisch (ν_{as}) erscheinen. Typischerweise werden noch Schwingungen in der Ebene (*engl.: in plane, ip*) und aus der Ebene heraus (*engl.: out of plane, oop*) unterschieden. Die Schwingungsmodi treten im Allgemeinen gekoppelt auf. Die Nummerierung von hoher zu niedriger Frequenz folgt dem Standard [260]. Die Intensität der Signale wird relativ zum gesamten Spektrum abgeschätzt: v = very/sehr, w = weak/schwach, m = medium, st = strong/stark, sh = shoulder/Schulter, shp = sharp/scharf, br = broad/breit. Speziell in dieser Arbeit wurden stellenweise Schwingungen gleicher Art in Gruppen (kurz Gp) zusammengefasst, um sie in verschiedenen Umgebungen vergleichen zu können (siehe Abschnitt 3.1.1).

Tabelle 4.8: Terminologie von IR-Schwingungen [260].

Symbol	Deutsch	Englisch	Bedeutung
ν	Streck-, Valenzschw.	strech	Distanz zwischen zwei Atomen ändert sich
δ	Scherenschw.	scissoring	Bindungswinkel ändert sich
ρ	kippen	rocking	eine Gruppe kippt in ihrer Ebene relativ zum Molekül
τ	verdrehen	twisting	eine Gruppe dreht relativ zum Molekül
ω	wippen	wagging	eine Gruppe kippt senkrecht zu ihrer Ebene zum Molekül
γ	strecken	strech	Defotmationsschwingung von planaren Gruppen aus der Ebene

Serin und Phosphoserin mit und ohne Calciumphosphat im IR

Tabelle 4.9: IR-Ergebnisse gemessener und simulierter Spektren mit Literaturdaten. PS synt = synthetisiertes Phosphoserin; PS CaP = nach Abschnitt 2.9 hergestellte Probe aus Phos- phoserin und Calciumphosphat; CaP = gleiches Herstellungsverfahren wie PS CaP, nur ohne Phosphoserin; Lit = Wert aus Literatur; HAp = gekauftes Hydroxylapatitpulver (siehe Hy- doxylapatit); 1:1 =Phosphoserin und HAp Pulver wurden trocken mit einem Gewichtsverhältnis von 1:1 gemischt und zu einer KBr Tablette gepresst; CP s = Simuliertes Spektrum eines (CaPO₄) × 2 Komplexes; PS CP s = Simuliertes Spektrum eines [PS Ca₂ HPO₄] Komplexes; Peak = Signalstärke, manchmal mit Angabe der Form des Peaks; I [%] = Peakstärke relativ zum grössten Peak (nur bei Simulationen) Interpretation = Schwingender Teil des Moleküls mit Literaturangabe; → = Interpretation zu gemessenem Signal; | = eine Erklärung, die für Messwerte aus mehreren Zeilen gilt wird durch eine senkrechte Linie zusammengefasst; : = (Poppelpunkt) symbolisiert Rauschen (meist mit H₂O assoziiert); sim = Simulation, eine Computersimulation ist Quelle des Wertes.

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
			111						w	7,36	[25] Sim. [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
		113							w	7,09	ρ O ₃ (PO)-Ca ²⁺
		130							w	4,95	ρ OH + ρ O ₃ (PO)-Ca ²⁺
			130						w	6,66	[25] Sim. [Ca ₃ PO ₄] ₂ , δ O-P-O, δ Ca-P-O
								232	v w	1,45	ω C-O ₂ , τ P-O
		272							m	27,50	δ (O-P-Ca ²⁺) × 2
			273						w	5,95	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O, ν Ca-O
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
								284	vw	2,96	δ P-O
		292	292						w	8,59	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
		306	304						m	41,84	(δ (O-P-Ca ²⁺) + τ (OH)) × 2
									w	8,33	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
									m	22,51	(δ (O-P-Ca ²⁺) + ρ (OH)) × 2
		406						374	v w	2,72	δ P-O
			406						m	32,32	(ρ (O-P-Ca ²⁺) + δ (O-P-O)) × 2
			406						w		[164] CaHPO ₄ (Monetit), δ P-O
			415								[136] OCP/DCPD, O-P-O(H)
							418		w		→ O-P-O(H), [136] OCP/DCPD 415
					419				w		→ O-P-O(H), [136] OCP/DCPD 415
	419								w		→ O-P-O(H), [136] OCP/DCPD 415
		424							v w	3,81	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O, δ O-P-O
								450	v w	1,67	δ P-O, δ C-O
		450							m	14,52	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, [147] OCP & HAp, P-O
							455		sh w		→ δ/ν P-O, C-O Schwingung, die
					459				m		durch stärkere Bindung mit Ca ²⁺ zu
											kürzeren Wellenlängen führt
	457								v w		→ δ O-P-O ([136] 462)
			462						sh w		[136] δ O-P-O
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
			463						w	7,38	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O, δ O-P-O
			470						w		[164] HAp, δ P-O
470			471						v w		[147] OCP & HAp, δ P-O → δ P-O ([164, 147] 470)
	471								w	6,69	[147] HAp, P-O von PO ₄ ν (P-Ca ²⁺) + δ PO ₂
			472		472				sh w		→ δ O-P-O [136] 472
									w		[136] δ O-P-O; [73] HAp
			474				472		sh v w		→ ν O-P-O [136]
									v w	5,75	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O, δ O-P-O
							480		st		→ δ C-O ([138] 507), δ/ν O-P-O ([136, 73] 472)
					484				v w		→ δ C-O ([138] 507), δ/ν O-P-O ([136, 73] 472)
							494		st		→ δ C-O ([138] 507), δ/ν O-P-O ([136, 73] 472)
						496			w		→ δ C-O ([138] 507), δ/ν O-P-O ([136, 73] 472)
			497						w	10,63	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
				507					v w		[138] Serin, δ C-O, δ C=O
				513							[138] Serin, δ C-O
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
			514						w	9,35	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
			515								[73] ν ₄ P-O
			518						w	13,59	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
					518				w sh		→ δ C-O, ([138] 513)
			525								[147] OCP, δ HO-P-O ₃
				526							[138] Serin, δ C-O, ν C-C
							526		st		→ δ C-O, ν C-C; ([138] 526)
			527			528			m	20,41	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O
									w		→ δ C-O, ν C-C; ([138] 526)
				532					w		[138] Serin, δ C-O, ν (C-C)
					536						→ δ C-O, ν C-C; ([138] 526)
								541	w	11,31	ρ N-H ₂ , τ P-O-H
542									st	66,88	ω (OPO) × 2
	547								st	53,15	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O,
											δ O-P-O, δ Ca-O-P
							550		st		→ δ C-O, ν C-C oder γ CH ₂ , γ OH
											sc, durch CaP verschoben/gedämpft
554									st	73,13	γ O ₃ zu P und Ca ²⁺
				558							[138] Serin, γ CH ₂ , γ OH
			560						st, br		[164] ACP, einzelnes, breites Band
											über verschiedene P _i Schwingungen
				560							[138] Serin, γ CH ₂ , γ O-H
											δ C-O, δ C-O
Fortsetzung nächste Seite ...											

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
565		561			562						[136] ν _s O-P-O; [147] OCP, P-O [73] HAp
									st		→ γ CH ₂ , γ OH sc, ([138] 568) P-O δ (T ₂), ([164, 73] 574) CO ₃ ²⁻ ([147] CO ₃ -HAp, 563)
		563							st		[164] HAp und ACP, δ P-O [147] CO ₃ -HAp, P-O
	564								st		→ δ P-O (T ₂) [164] CaHPO ₄ (Monetit)
		565							m	23,39	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O
									st		→ δ P-O (T ₂) [164] CaHPO ₄ (Monetit)
		566							sh		[164] CaHPO ₄ (Monetit), δ P-O (T ₂)
				568							[138] Serin, γ CH ₂ , γ OH sc
		568			569				m	34,69	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O
									m		→ γ CH ₂ , γ OH sc, ([138] 568) δ P-O (T ₂), ([164, 73] 574)
571							569		st		→ γ CH ₂ , γ OH sc, ([138] 568) δ P-O (T ₂), ([164, 73] 574)
									sh v w		→ δ P-O (T ₂); [164] HAp, [73] HAp
		574							sh		[164] HAp, δ P-O (T ₂)
		574							sh st		[136] [δ O-P-O]
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca^{2+} mit P_i [cm^{-1}]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm^{-1}]				Metainformation	
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak I [%]
				575					[73] HAp
				576					[138] Serin, γ OH, δ C-O
								577	ρ CO_2 , ρ C-NH ₃
		580							8,12
									7,23
				586-589					[25] sim [Ca_3PO_4] ₂ , ν Ca-O, ν P-O
							586		[138] Serin, γ OH δ C-C, γ/δ C-O
									$\rightarrow \gamma$ OH δ C-C, γ/δ C-O; [138] Serin
									δ O-P-O + gesamtes PS
								588	[25] sim [Ca_3PO_4] ₂ , ν Ca-O
		590							ν P-O, δ O-P-O
						590			$\rightarrow \gamma$ OH δ C-C, γ/δ C-O
									[138] Serin; die 586 durch CaP
									unterdrückt und verschoben
					591				$\rightarrow \gamma$ OH δ C-C, γ/δ C-O
									[138] Serin; die 586 durch CaP
									unterdrückt und verschoben
				592					[138] Serin, γ CH ₂ , γ OH
		600							[147] OCP & HAp, P-O
				601					[73] HAp
						602			$\rightarrow \delta$ O-P-O; [136], [147] OCP & HAp
					602				$\rightarrow \delta$ O-P-O; [136], [147] OCP & HAp
	602								$\rightarrow \delta$ O-P-O; [136], [147] OCP & HAp
									[136] δ O-P-O
602			602						$\rightarrow \delta$ O-P-O; [136], [147] OCP & HAp

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
			604						m		[164] HAp, P-O bend (T ₂)
			605						st	54,31	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν Ca-O, ν P-O
								605	v w	3,85	τ C-NH ₃ , δ Ca-COO
							619		w		→ Phosphatgruppe der PS
			628								[147] OCP, P-O
					630				w br		→ Phosphatgruppe des P-Ser
											P-O [147] 628
			629						v w	1,74	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ρ Ca-O-Ca
			630								[210] HAp, OH ⁻
630									m		→ OH in HAp [210, 136]
			631						m		[136] m vL hxdroxyl Gruppe, [73]
											HAp
									sh v w		→ OH in CaP _i [210, 136]
	632								st	64,42	δ O-P-O bei Ca ²⁺
		633							m	19,79	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O
			637						w	15,73	ρ Ca-O-Ca
				638							
				643							[138] Serin, δ C-O, ν C-O bb
				657						30,92	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O
								656	w	15,47	ρ COO, τ PO-H, δ C-C-C
						668			m		→ PS-typische Phosphatschwin- gung vermutlich ρ COO, τ PO-H δ C-C-C (PS CaP sim bei 656)
				668							[67] ν PO ₄ ³⁻ Simulation
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
670					668				m		→ P-Ser typische Phosphatserin-gung vermutlich ρ COO, τ PO-H δ C-C-C (PS CaP sim bei 656)
							668		w		→ PS-typische Phosphatserin-gung, vermutlich ρ COO, τ PO-H δ C-C-C (PS CaP sim bei 656)
									v w		→ ν PO ₄ ³⁻ ; [67] 668
					705				sh w		→ ρ C-COO (sim 714)
								714	v w	6,53	ω C-COO
					720				m		→ ρ C-COO ([138] 723, δ C=O sim 713)
				723							[138] Serin, δ C=O
							732		v st		→ C-O und C-COO
				736			745		v st		[138] Serin, ν C-C ν C-C, ν C-O → ρ C-COO
											([138] 723, δ C=O, sim 713)
802											[138] Serin, ν C-C, δ C-O, ν C-O
								778	w	10,32	ν P-O ₃ + δ C-O
					788				st		[138] Serin, ν C-C, ν C-O → ν C-C, ν C-O, [138] 785
				800			800		st		→ γ OH, γ NH ₂ [138] Serin 800
									w	5,53	[138] Serin, γ OH, γ NH ₂ ν _s (P-O ₄)

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation				
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation	
824				808					m		[138] Serin, γ OH → γ NH ₂ , ν N-C, ν C-C, [138] 816	
				816		812			w	9,42	[138] Serin, γ NH ₂ , ν N-C, ν C-C ν P-O ₃ + δ C-O	
								818	sh w		→ keine Referenz gefunden	
						824			v w		→ keine Referenz gefunden	
840				828					v w	8,85	[138] Serin, γ NH ₂ , γ O-H γ C-C-O ₂	
								837	w		→ δ/ν CO ₃ ²⁻ , [136], HAP mit CO ₃ ²⁻	
				846							[138] Serin, ν N-C, γ O-H, ν C-C	
875			864	860							[138] Serin, γ NH ₂ [136], HAP mit CO ₃ ²⁻ , δ/ν CO ₃ ²⁻	
			868					865	w	13,16	δ O-C-O, ν O-P-O ₂ [136] ν P-O(H)	
				869					m	19,21	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O, δ Ca-O-P	
				870							[138] Serin, ν C-C	
											[136], δ + ν CO ₃ ²⁻ ; HAP mit CO ₃ ²⁻	
				868							[136], ν _s HPO ₄ ²⁻ in CO ₃ ²⁻ -HAP	
											[164] HAp, [147] CO ₃ ²⁻ -HaP, C-O	
				873								[138], γ (OH)bb, Serin
				875								[136], HAP typischen HPO ₄ ²⁻ Peak
												[136], δ + ν CO ₃ ²⁻ , HAP mit CO ₃ ²⁻ → δ + ν CO ₃ ²⁻ ; [136] HAp mit CO ₃ ²⁻ → HAP mit δ/ν CO ₃ ²⁻ [136]

Fortsetzung nächste Seite ...

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation				
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation	
900					878	877	876		m		→ γ (OH), [138], Serin	
			883						sh w		→ HAP mit δ/ν CO ₃ ²⁻ [136]	
			885						m		→ HAP mit δ/ν CO ₃ ²⁻ [136]	
											[136], δ + ν CO ₃ ²⁻ ; HAP mit CO ₃ ²⁻	
									w		[138] Serin, ν C-C, ν C-O	
											→ ν C-C, ν C-O, [138] Serin	
									st	37,32	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O	
									w	10,68	ν C-CO ₂ , ν P-O	
												[164] CaHPO ₄ (Monetit), ν P-OH
			898							v w		→ ν P-OH, [164] CaHPO ₄ (Monetit)
936							903		m		→ γ (NH ₂), [138] Serin	
								905	v w	2,23	ν P-O ₃	
			914								[138] Serin, γ NH ₂	
			913						st	42,16	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O, δ O-P-O	
						920			w		→ γ (NH ₂), [138] Serin	
			920						m		[214] PO ₄ ³⁻ von P-Ser in	
											Festkörper, nicht pH abhängig	
			935						st	49,97	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O	
									st			
									v w	1,29	ν O-P-O ₃	
958								940	v w			
								948	v w	1,73	ν O-P-O ₃	
			958						st	56,75	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O	
					958				sh w		→ ν ₁ PO ₄ ³⁻ (4, 14), [78] Method two	

Fortsetzung nächste Seite ...

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca^{2+} mit P_i [cm^{-1}]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm^{-1}]				Peak	I [%]	Metainformation	
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s		Interpretation	
			959							[78] νPO_4^{3-}	
961									m	[78] $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$	
				960						$\rightarrow \nu_s\text{PO}_4$, [136] HAp; [78]	
				961						[78], $\nu_1\text{PO}_4$	
				962						[136] HAp, $\nu_s\text{PO}_4$	
							969		m	[136] $\nu_s\text{PO}_4^{3-}$	
				971						$\rightarrow \nu\text{N-C}$, [138] 971	
				973					st	[138], $\nu\text{N-C}$	
						973				[138], $\nu\text{C-O}$	
										\rightarrow [138], $\nu\text{C-O}$ oder	
										[214] dianion. symmetr. Streckung	
										[214] PO_4^{3-} aus P-Ser in	
										Festkörper, nicht pH abhängig;	
982										[78] PO_4^{3-} in HAp	
				984						oder $\nu_s\text{PO}_4^{3-}$ in Brushit	
985										[90] P-Ser, deprot. Phosphatgrp.	
										[78] PO_4^{3-} in HAp	
							986		m	oder $\nu_s\text{PO}_4^{3-}$ in Brushit	
										\rightarrow [78] PO_4^{3-} in HAp	
				993						oder $\nu_s\text{PO}_4^{3-}$ in Brushit	
										[138], $\nu\text{C-C} + \gamma\text{NH}_2$	
999						1000			st	[78, ν_{as} 999 - 1004 cm^{-1}]	
										$\rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
					1007				sh v w		→ PO ₄ ³⁻
			1014						st	48,66	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O, δ O-P-O, δ Ca-O-P
		1024	1020						m	42,49	[78, ν PO ₄ ³⁻ aus nichtstöch. Apatit]
								1026	w	17,84	ν _s O-P-O ₃ (ν P-O(H))
		1027							st	57,56	ν P-O, ν C-CO ₂
			1029								ν _s O-P-O ₃ (ν P-O(H))
											[138], ν C-C sc + ν C-O bb + ν NH ₂ , Serin
											[78] ν PO ₄ ³⁻
		1030									[78] ν ₃ PO ₄ ³⁻ in stöchiom. Apatit
		1032							sh w		[136], ν _{3as} P-O
							1033		st		→ ν _{as} P-O [136] (1032); [78]
									st		→ ν _{as} P-O [136] (1032); [78]
1035			1036						v st	100,00	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O
											[78] ν ₃ PO ₄ ³⁻ , das nicht Teil von OCP ist
									st		→ ν _{as} P-O [136] (1032); [78]
						1042			v st		deformiert
									m	25,91	→ PO ₄ ³⁻
			1046						sh w		[136], ν _{as} P-O degeneriert
					1039				st		→ PO ₄ ³⁻
					1050						→ PO ₄ ³⁻
			1055								[78], ν PO ₄ ³⁻

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
1060		1068	1057	1057	1060	1057			st	45,68	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O
									v st		deformiert
									st		→ PO ₄ ³⁻
									st		→ PO ₄ ³⁻
1094	1094		1073		1082	1091	1077		v st	99,96	ν _s O-P-O ₃ (ν P-O(H))
									w	10,30	ν P-O ω C-N-H
									w	8,74	ν P-O ω C-N-H
											[138], ν C-O sc + ν N-C + ν C-C sc, Serin
									m	35,77	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , δ Ca-O-H
											[136], HPO ₄ ²⁻
											[78], ν PO ₄ ³⁻
									st		→ PO ₄ ³⁻
									sh w		→ PO ₄ ³⁻
											[136], ν _{as} P-O, degeneriert
1096			1074		1082	1091	1077		v st		deformiert
											[136] HPO ₄ ²⁻ oder CO ₃ ²⁻
									m	25,84	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O
											[138], ν N-C + ν C-C sc, Serin
									st		→ PO ₄ ³⁻
									sh m		→ PO ₄ ³⁻
1096			1096					1107			[78] ν PO ₄ ³⁻
											[78], ν PO ₄ ³⁻
									v w	3,41	ν H-C-C-N-H

Fortsetzung nächste Seite ...

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca^{2+} mit P_i [cm^{-1}]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm^{-1}]				Metainformation	
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak I [%]
				1112					[78], in frisch ausgefälltem, schlecht kristallinem HAp gefunden
				1113				m	34,34 [25] sim $[\text{Ca}_3\text{PO}_4]_2$, ν P-O
				1116					[78], in schlecht kristallinem HAp gefunden
									[78] in reifem, schlecht kristallinem HAp gefunden
				1124			1119	m	$\rightarrow \nu$ C-O bb, δ OH bb, [138] 1124
						1125		sh m	[138] Serin, ν C-O bb, δ OH bb $\rightarrow \text{PO}_4^{3-}$
	1127			1136				sh v w	[78] Brushite, ν HPO_4^{2-} degen.
							1140	sh w	[138], ν C-O bb + δ (OH)bb + ν (N-C), Serin
	1145								$\rightarrow \nu$ C-O bb, δ OH bb, ν N-C, ([138] Serin 1136)
				1150		1156		m	[78], gefunden in HPO_4^{2-} enthaltenem HAp
									[138], δ OH ss, τ CH_2 , ρ NH_2 , Serin \rightarrow [138], δ OH ss, τ CH_2 , ρ NH_2 , Serin
				1163				w	5,77 ν P-O, ω C-NH ₃
							1164	m	[138], ρ NH_2 , Serin
								w	$\rightarrow \rho$ NH_2 , [138] Serin
									5,66 ν P-O

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
1260				1194		1167			m		→ [138] Serin, ρ NH ₂ [214], ν _{as} Phosphat, monoanionisches PS
								1195	v w	1,68	ν P-O, δ C-NH ₃
				1215				1219	w	6,79	[136], δ O ₃ -P-O...H...O-P-O ₃ ν C-C ω NH ₂
				1227							[138] Serin, δ OH bb, δ CH, γ CH
				1230					st		[226] Aminosäuren, ν C-O
							1235		sh v w		→ δ OH bb, δ CH, γ CH, [138] 1227
							1244		st		→ ρ CH ₂ , δ OH sc, ρ NH ₂ , [138] 1265
							1256		st		→ ρ CH ₂ , δ OH sc, ρ NH ₂ , [138] 1265
						1260			st		→ ρ CH ₂ , δ OH sc, ρ NH ₂ , [138] 1265
				1265					st		[138] Serin, ρ CH ₂ , δ OH sc, ρ NH ₂
					1267			w br		→ ρ CH ₂ , δ OH sc, ρ NH ₂ , [138] 1265	
								w			
						1276			st		→ γ CH, δ CH, [138] 1278
			1278								[138] Serin, γ CH, δ CH
1280	1280										Beginn des Rauschens durch H ₂ O
:	:					1300					Beginn des Rauschens durch H ₂ O
:	:				1315	:			w		→ ρ CH ₂ , δ OH sc, ([138] 1328)
:	:		1328			:					[138] Serin, ρ CH ₂ , δ OH sc
:	:				1337	:			w		→ ρ CH ₂ , δ OH sc, ([138] 1328)
:	:					:				45,12	ν C-N
:	:		1344			:		1337	m		[138], δ OH sc, Serin

Fortsetzung nächste Seite ...

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
:	:					:	1349		m		→ [138], δ OH sc, Serin 1344
:	:					:	1355		m		→ ρ CH ₂ , [138] 1367
:	:					:		1366	m	16,70	τ C-H ₂ , δ PO-H
:	:		1367			:					[138] Serin, ρ CH ₂
:	:		1374			:					[138] Serin, δ OH bb, ν C-O bb
:	:					:	1374		st		→ [138] Serin, δ OH bb, ν C-O bb
:	:				1376	:			m		→ δ CH, ([138] 1384)
:	:		1384			:					[138] Serin, δ CH
:	:					:		1389	v w	5,06	ν PO-C, δ PO-H
:	:		1399			:			v w		[138], δ OH sc + ρ CH ₂ , Serin
:	:		1409			:			v w		[138], δ OH sc + ρ CH ₂ , Serin
:	:					:		1424	m	35,03	ν/δ H-C-C-H
:	:	1425				:				41,24	δ P-O-H
:	:					:	1437		w		→ δ CH ₂ , [138] 1457
:	:					:		1456	w	14,95	ν/δ H-C-C-H
:	:				1456	:			m		→ Serin, δ CH ₂ , ([138] 1457, sim 1456)
:	:		1457			:			w		[138] Serin, δ CH ₂
:	:		1470			:			m		[54] ν _{s+as} COO
:	:				1475	:			w		→ δ CH ₂ , [138] 1476
:	:					:	1465		m		→ ν _{s+as} COO, [54] 1470
:	:		1467			:					[144, Phosphatidylserin, fixierte CH-Seitenkette]
:	:		1476			:					[138] Serin, δ CH ₂
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
:	:			1477		:					[144, Phosphatidylserin, freie CH-Seitenkette]
:	:				1489	:			w		→ δ CH ₂ , [138] 1476
:	:				1506	:			w		→ δ CH ₂ , [138] 1476
:	:				1522	:			m		→ δ CH ₂ , [138] 1476
:	:					:		1523	m	31,46	τ/ω CH ₂ /NH ₂
:	:				1541	:			w		→ [138], δ NH ₂ , Serin 1590
:	:					:		1543	m	28,20	δ C-C-H
:	:					:	1554		st		→ [138], δ NH ₂ , Serin 1590
:	:				1560	:			w		→ [138], δ NH ₂ , Serin 1590
:	:		1590			:			w		[138], δ NH ₂ , Serin
:	:		1608			:					[138], δ NH ₂ , Serin
:	:					:		1616	v w	4,95	ν _{as} O-C-O + ν NH
:	:					:	1620		st		→ ν COO [54] + δ NH ₂ , [138] 1620
:	:		1621			:					[54] ν COO ⁻
:	:		1624			:					[138] Serin, δ NH ₂
:	:		1626			:			st		[54] ν _{s+as} COO
:	:					:		1632	m	20,00	ν C-O, τ H-N-H
:	:				1646	:			v br		→ δ NH ₂ , [138] 1646
:	:		1646			:			v w		[138] Serin, δ NH ₂
:	:					:		1693	v w	8,15	δ H-N-H, ω H-C-H, ν C-O
:	:					:		1746	v w	4,89	δ H-N-C
:	:		1773			:			w		[138], ν (C=O), Serin
:	:					:		1782	v w	4,59	δ H-C-H
Fortsetzung nächste Seite ...											

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
:	:			1788		:			m	21,76	[138], v (C=O), Serin
:	:					:		1830			δ H-C-H, δ H-N-C
:	:					:		1895	v st	100,00	δ H-N-H, δ H-C-H
:	:					:		1924	v w	3,70	δ H-N-H
:	:			2000		:					[136], w Oberschwingung
2150	:			2070		:					[136], w Oberschwingung
:	:					:		2120	v st	98,00	ν_{as} C-O, δ_s N-H, δ_s C-H
:	:					:		2206	v st	99,00	ν_{as} C-O, δ_s N-H, δ_s C-H
	2120					2100					Ende der Wasser Schwingungen
						2336					\rightarrow CO ₂
					2340				m		\rightarrow CO ₂
2345							2341		m		\rightarrow CO ₂
									m		\rightarrow CO ₂
	2340								m		\rightarrow CO ₂
						2447			v w		\rightarrow CO ₂
							2359		m		\rightarrow CO ₂
	2360								m		\rightarrow CO ₂
					2360				m		\rightarrow CO ₂
2372						2360			br v w		\rightarrow CO ₂
							2494		v w		$\rightarrow \nu_{s/as}$ CH ₂ , [138] Serin (2845)
					2455				w		$\rightarrow \nu_{s/as}$ CH ₂ , [138] Serin (2845)
						2511			v w		$\rightarrow \nu_{s/as}$ CH ₂ , [138] Serin (2845)
							2533		br w		$\rightarrow \nu_{s/as}$ CH ₂ , [138] Serin (2845)
					2558				v w		$\rightarrow \nu_{s/as}$ CH ₂ , [138] Serin (2845)

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
2843						2554	2577		w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									br w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									br m		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									m		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									br v w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									w		→ ν _{s/as} CH ₂ , [138] Serin (2845)
									br w		[164] CaHPO ₄
			2845		2715	2757	2749		w		→ HPO ₄ ²⁻ [73, 164] OCP
											[138] Serin, ν _{as} CH ₂ , ν _s CH ₂
									m		→ ν _{as} CH ₂ , ν _s CH ₂ , [138] Serin (2845)
									sh w		→ [138] Serin, ν _{as} CH ₂ , ν _s CH ₂
											(2845)
					2852				br w		[73] OCP
									w		→ [138] Serin, ν _{s/as} CH ₂ , (2845)
											[138] Serin, ν _{s/as} CH ₂
									v st		[138] Serin, ν _{s/as} CH ₂
2908					2900	2907			m		→ ν CH, [138] 2915
									w		→ ν CH, [138] 2915
											→ HPO ₄ ²⁻ [73, 164] OCP
											[138] Serin, ν CH
Fortsetzung nächste Seite ...											

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
2979	ab 3300	ab 3300	2923	2951	2924	2960	2953	2965	w		[164] HO → ν CH, [138] 2915 ν _{as} CH ₂ [144] → ν _{s/as} CH ₂ , [138] 2995 → ν _{s/as} CH ₂ , [138] 2995 → HPO ₄ ²⁻ [73, 164] OCP → ν _{s/as} CH ₂ , [138] 2995
			3070	3169	3208	3108	3100	3110	w		[136], 3572 ν hydroxyl Gruppe → ν OH / ν NH ₂ , [138] → ν OH / ν NH ₂ , [138] ν _s N-H ν C-H → ν OH / ν NH ₂ , [138] → ν OH / ν NH ₂ , [138] → ν OH / ν NH ₂ , [138] → ν OH / ν NH ₂ , [138] → ν OH / ν NH ₂ , [138] → OH Schwingungen
ab 3300	:	:	3400	3414	:	:	:	:	st		[136], δ O-P-OH [138], ν _{as} NH ₂ , Serin ν C-H ν N-H ν C-H
:	:	:	3666		:	:	:	:	v st		[136], 3572 ν _s , hydroxyl Gruppe ν C-H
:	:	:			:	:	:	:	st		ν C-H

Fortsetzung nächste Seite ...

nur Ca ²⁺ mit P _i [cm ⁻¹]				Probe enthält (Phospho)Serin [cm ⁻¹]				Metainformation			
HAp	CP	CP s	Lit	Lit	PS CP	1:1	PS	PS CP s	Peak	I [%]	Interpretation
:	:				:	:	:	3706	m	46,67	ν C-H
:	:			3735	:	:	:		w	14,45	[25] sim [Ca ₃ PO ₄] ₂ , ν P-O
:	:				:	:	:	3746	st	51,84	ν N-H ν C-H
:	:				:	:	:	3880	w	15,50	ν N-H
:	:				:	:	:	3918	m	22,79	ν N-H
:	:				:	:	:	4004	st	59,53	ν N-H

Serin und Phosphoserin im ESI-MS

Als Referenz zu der Phosphoserin-Calciumphosphat Probe wurde Phosphoserin in Wasser und Ca^{2+} -Lösung gemessen sowie Serin in Aq. dest., Ca^{2+} -Lösung und Calciumphosphatlösung. Die ausführliche Beschreibung zu diesen Ergebnissen ist ab Seite 59 zu finden. Auf den folgenden Seiten sind die Massenspektren mit den jeweiligen Tabellen mit der Zuordnung der m/z (Masse pro Ladung) Werte zu den passenden Molekülspezies gegeben. In allen serin- und phosphoserinhaltigen Proben wurde Amoniumacetat (1% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) mit Ethanol ($\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$) 1:1 gemischt und als Laufmittel verwendet (Präparation siehe Seite 30).

Tabelle 4.10: Serin in Wasser im ESI-MS. I.=Intensität

m/z	Ionenspezies	I.	Interpretation
106	Serin	++++	wie zugegeben
128	$\text{Ser} + \text{Na}^+$	+	Komplexe aus Natrium und Serin
150	$\text{Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	+	
175	$\text{PO}_4^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	Mineralkeim
193	Ser-Ser	+	Dimer (Wasserabspaltung)
211	2x Ser	++	Komplex (ionische Bindung, keine Wasserabspaltung)
249	2x Ser + Ca^{2+}	++	
287	2x (Ser + Ca^{2+})	++	möglicherweise sind Reste von Ca^{2+} aus vorherigen
354	3x Ser + Ca^{2+}	++	MS-Läufen vorhanden
382	3x (Ser + Na^+)	++++	ähnliche Intensität wie reines Serin
385	2x Ser-Dimer	++	im Spektrum 465
392	3x Ser+ 2x Ca^{2+}	++	
421	4x Ser	++	
464	4x Ser + 2x Na^+	++	
497	2x (2x Ser + Ca^{2+})	+++	

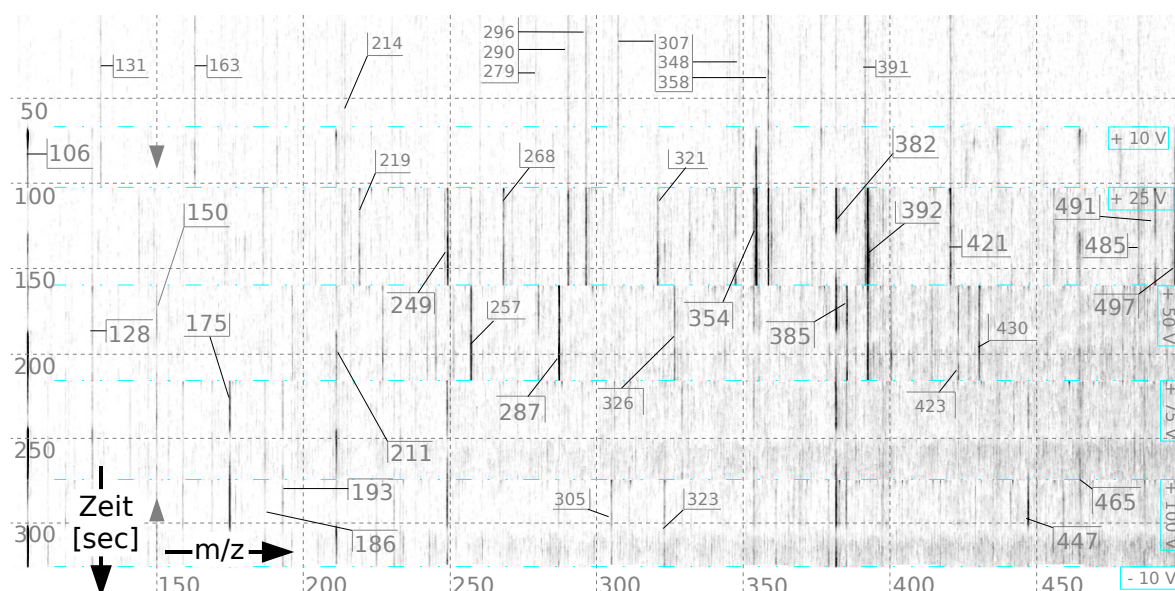


Abbildung 4.2: Serin in destilliertem Wasser im ESI-MS

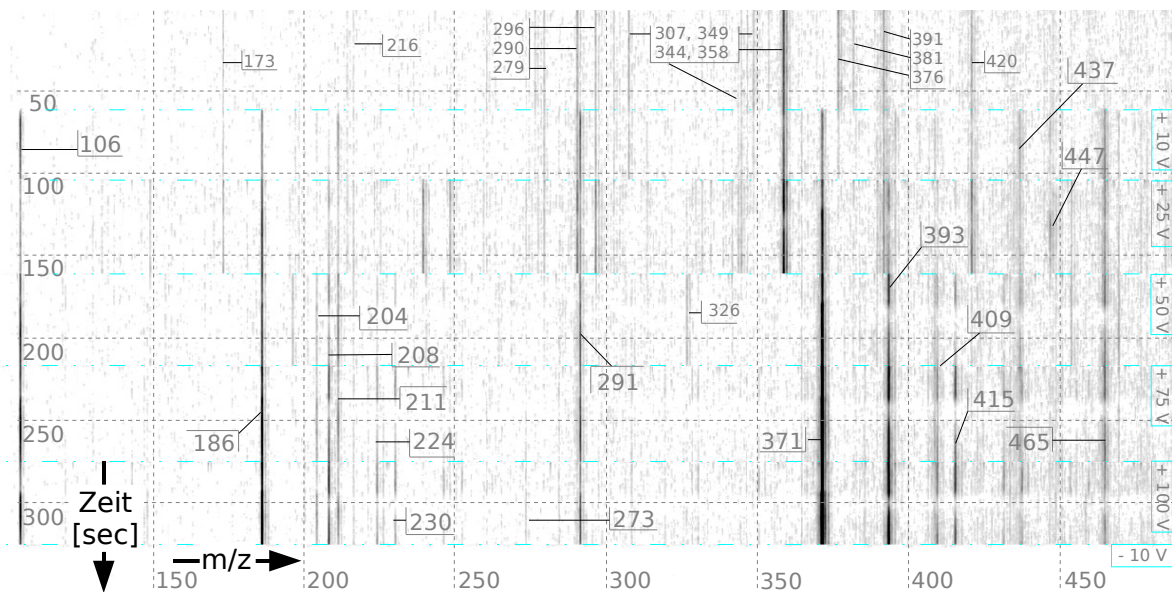


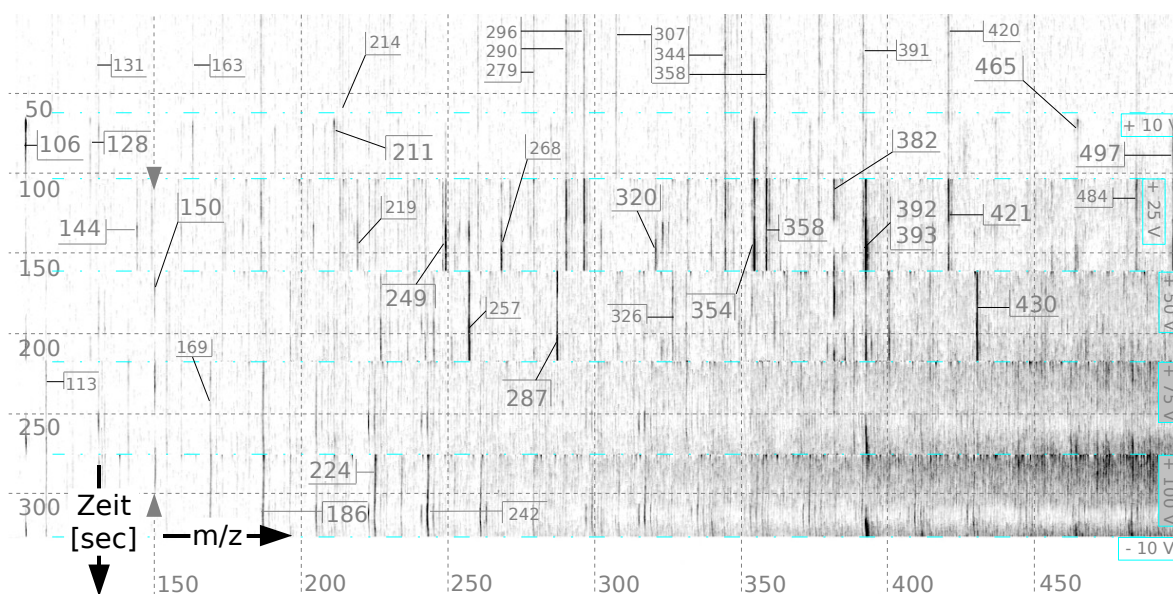
Abbildung 4.3: Phosphoserin in destilliertem Wasser im ESI-MS

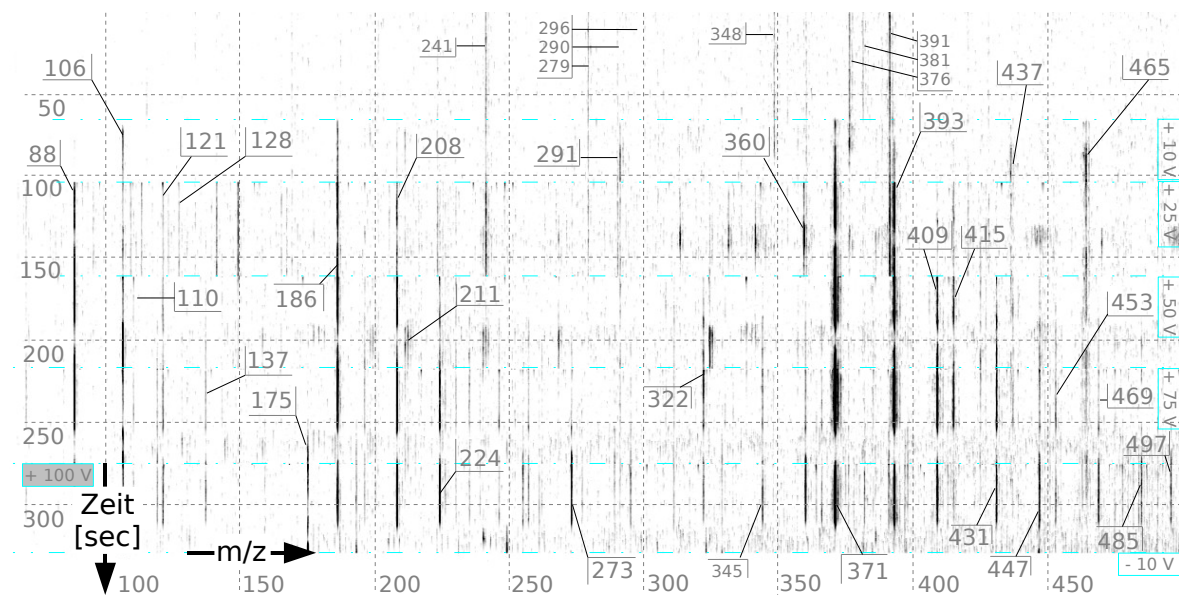
Tabelle 4.11: Phosphoserin in Aq. dest. im ESI-MS, I.=Intensität

m/z	Ionenpezies	I.	Interpretation
106	Serin	+++	vermutlich aus vorherigen MS-Läufen
186	P-Ser	+++++	wie zugegeben
208	P-Ser + Na ⁺	+++	schwächer als reines P-Ser, stärker als P-Ser+ Ca ²⁺
211	2x Ser	++	Komplex (ionische Bindung, keine Wasserabspaltung)
224	P-Ser + Ca ²⁺	+	vermutlich Reste von Ca ²⁺ , aus vorherigen Läufen, schwaches Signal
230	P-Ser + 2 Na ⁺	+	
273	P-Ser + Ser	+	Dimer (Peptidbindung) schwach
291	Ser + P-Ser	++	Komplex (ionische Bindung)
371	2x P-Ser	+++++	Komplex (ionische Bindung)
393	2x P-Ser + Na ⁺	+++++	Komplex (ionische Bindung)
409	2x P-Ser + Ca ²⁺	++	schwaches Signal
415	2x P-Ser + 2x Na ⁺	++	
437	2x P-Ser + 3x Na ⁺	++	
447	2x P-Ser + 2 Ca	+	schwach
465	4x Ser + 2x Na ⁺	++	

Tabelle 4.12: Serin mit CaCl_2 -Lösung im ESI-MS. I.=Intensität

m/z	Ionenspezies	I.	Kommentar
106	Ser^+	++	
128	$\text{Ser} + \text{Na}^+$	+	Komplexe mit Ca^{2+} und Na^+ sind kaum vorhanden
144	$\text{Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	+	
150	$\text{Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	++	
186	P-Ser^+	++	Signal schon vor Einspritzen vorhanden
211	$\text{Ser} + \text{Ser}^+$	+	
224	$\text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	++	ähnlich starkes Signal wie Spezies ohne Ca^{2+}
249	$2 \text{Ser} + \text{Ca}^{2+}$	++	
287	$\text{Ser}^- + \text{Ser}^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	
320	$\text{Ser}_2 + \text{Na}^+ + \text{Ser}$	+	
354	$\text{Ser}^- + \text{Ca}^{2+} + 2 \text{Ser}$	+++	
358	$\text{Ser-Ser}^- + \text{Na}^+ + \text{Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	++	
382	$2 \text{Ser}^- + \text{Ser} + 3 \text{Na}^+$	++	
392	$\text{Ser} + \text{Ser}^- + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	Die beiden Signale verschmelzen
393	$2 \text{P-Ser} + \text{Na}^+$	++	
421	$4 \times \text{Ser}$	++	
430	$(\text{Ser} + \text{Ca}) \times 3$	+++	
465	$3 \text{Ser} + \text{Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	+	
497	$3 \text{Ser}^- + \text{Ser} + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	

Abbildung 4.4: Serin in CaCl_2 -Lösung im ESI-MS

Abbildung 4.5: Phosphoserin mit CaCl_2 im ESI-MSTabelle 4.13: Phosphoserin in CaCl_2 -Lösung im ESI-MS.

m/z	Spezies	I.	Interpretation
88	$\text{HPO}_4^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+}$ $\text{Ser}^+ - \text{H}_2\text{O}$	+++	Ladung: +2 Serin ohne Wasser
106	Ser^+	+++	vermutlich aus einem vorherigem MS-Lauf
110	$\text{Ser} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+$	+	
121	$\text{Ser}^+ + \text{O}$	++	ähnliche Masse: $\text{Ser} + \text{NH}_3 = 122$
128	$\text{Ser} + \text{Na}^+$	+	schwach
137	$\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	+	
175	oder $\text{PO}_4^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+}$		Mineralkeim
186	P-Ser	++++	wie zugegeben
208	P-Ser + Na^+	+++	
211	Ser + Ser^+	+	als Komplex, sehr schwach
224	P-Ser $^-$ + Ca^{2+}	+++	etwas schwächer als P-Ser + Na^+
273	P-Ser $^+$ + Ser oder $\text{HPO}_4^{2-} \cdots 2 \text{Ca}^{2+} \cdots \text{PO}_4\text{H}_2^-$	++	
291	Ser + P-Ser $^+$	++	Ionenkomplex
322	P-Ser + $\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	+++	
344	P-Ser + $\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} + \text{Na}^+$	++	
360	P-Ser-Ser-Ser $^+$	++	Trimer
371	P-Ser + P-Ser $^+$	+++++	starke Signale, offenbar
393	2 P-Ser + Na^+	+++++	sehr stabile Komplexe
409	P-Ser + P-Ser $^-$ + Ca^{2+}	++++	
415	P-Ser + P-Ser $^-$ + 2 Na^+	++++	
431	2 P-Ser $^-$ + Na^+ + Ca^{2+}	+++	
437	2 P-Ser $^-$ + 3 Na^+	++	
447	P-Ser $^-$ + P-Ser $^{2-}$ + 2 Ca^{2+}	+++	
453	P-Ser $^-$ + P-Ser $^{2-}$ + 2 Na^+ + Ca^{2+}	++	
465	3 Ser + Ser $^-$ + 2 Na^+	++++	
469	2 P-Ser $^{2-}$ + 2 Ca^{2+} + Na^+	++	
485	P-Ser $^{2-}$ + P-Ser $^{3-}$ + 3 Ca^{2+}	+	
497	3 Ser $^-$ + Ser + 2 Ca^{2+}	++	

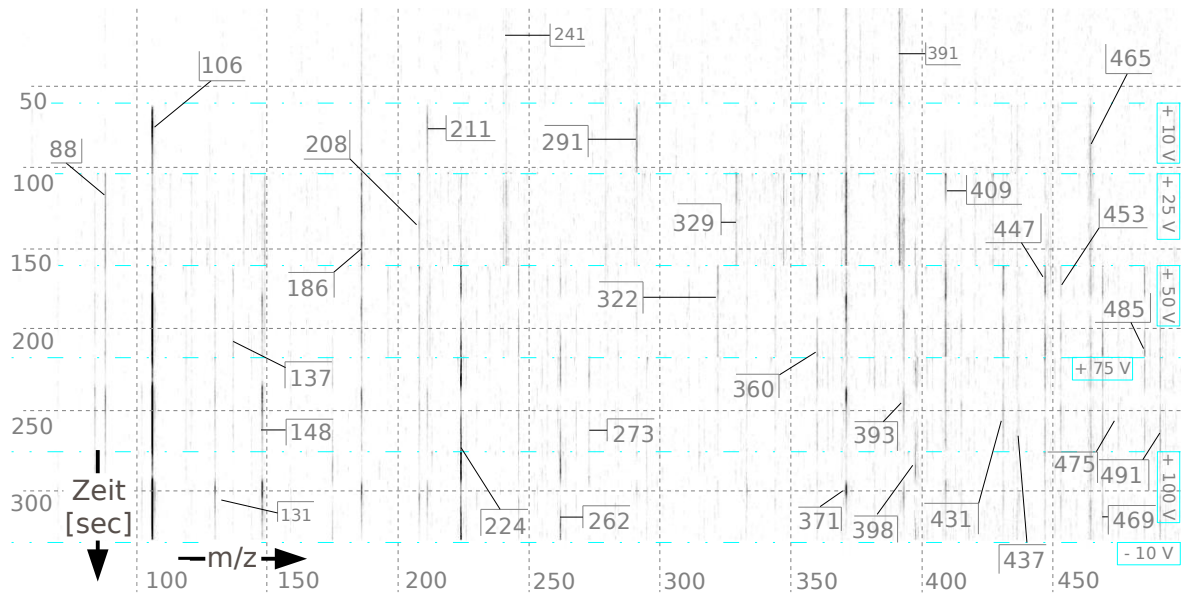


Abbildung 4.6: Serin in Calciumphosphatlösung im ESI-MS

Tabelle 4.14: Serin in Calciumphosphat Lösung. MS-RUN siehe Abbildung 4.6

m/z	Ionenspezies	I.	Kommentar
88	$\text{HPO}_4^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+}$ $\text{Ser}^+ - \text{H}_2\text{O}$	+++	Ladung: +2 Serin ohne Wasser
106	Ser^+	+++++	wie zugegeben
137	$\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{Ca}^{2+}$	++	
144	$\text{Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	+	sehr schwach
148	$[2 \text{PO}_4^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+]:2$	+++	$\text{Ser}^{2-} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+}$
175	$\text{PO}_4^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	+	
186	P-Ser^+	+++	aus vorherigen MS-Läufen
208	$\text{P-Ser} + \text{Na}^+$	++	schwach
211	$\text{Ser} + \text{Ser}^+$	++	als Komplex
224	$\text{P-Ser} + \text{Ca}^{2+}$	+++	
262	$\text{P-Ser}^{3-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	schwach
273	P-Ser-Ser^+ oder $\text{HPO}_4 \cdots 2\text{Ca}^{2+} \cdots \text{PO}_4\text{-H}_2$	+	
291	$\text{Ser} + \text{P-Ser}^+$	++	Komplex
322	$\text{P-Ser} + \text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	++	Komplex, bei starker Spannung
329	$\text{Ser} + \text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	++	bei schwacher Spannung
360	P-Ser-S-S^+	++	Trimer
371	$\text{P-Ser} + \text{P-Ser}^+$	+++	aus vorherigen MS-Läufen
393	$2 \text{P-Ser} + \text{Na}^+$	+++	
398	$\text{P-Ser}^{2-} + 3 \text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-}$	++	Mineralkeim an Phosphoserin, schwaches Signal
409	$\text{P-Ser} + \text{P-Ser}^- + \text{Ca}^{2+}$	++	
431	$2 \text{P-Ser}^- + \text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+}$	++	
437	$2 \text{P-Ser}^- + 3 \text{Na}^+$	+	
447	$\text{P-Ser}^- + \text{P-Ser}^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	
453	$\text{P-Ser}^- + \text{P-Ser}^{2-} + 2 \text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+}$	++	
465	$3 \text{Ser} + \text{Ser}^- + 2 \text{Na}^+$	+++	
469	$2 \text{P-Ser}^{2-} + 2 \text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+$	++	schwach
475	$2 \text{P-Ser}^{2-} + 3 \text{Na}^+ + \text{Ca}^{2+}$	++	schwach
485	$\text{P-Ser}^{2-} + \text{P-Ser}^{3-} + 3 \text{Ca}^{2+}$	++	
491	$\text{P-Ser}^{2-} + \text{P-Ser}^{3-} + 2 \text{Na}^+ + 2 \text{Ca}^{2+}$	++	

Verworfenene ESI-MS Signale zu Serin P-Ser Proben

Da die Probe als Auftragsmessung in einer Reihe anderer Proben gemessen wurden, sind auch Signale sichtbar, die nicht aus der Präparation stammen. Die Gründe zum Verwerfen von MS-Signalen sind:

- Das Signal ist vor dem Einspritzen vorhanden
- Das Signal zeigt keinerlei Korrelation mit Einspritzten der Probe
- Das Signal zeigt eine Masse die zu der zuvor eingespritzt wurde
- Das Signal zeigt eine Masse, die durch keine denkbare Kombination der eingebrachten Moleküle oder deren Bruchteile erreichen lässt

Tabelle 4.15: Reihenfolge der ESI-MS Messungen von Serin und Phosphoserinlösungen

Reihenfolge	Messnummer	Inhalt
1	73531	Phosphoserin in Aq. dest.
2	73532	Serin in CaCl ₂
3	73533	Serin in Aq. dest.
4	73534	Phosphoserin in CaCl ₂
5	73535	Phosphoserin in CaCl ₂
6	73562	Serin in CaCl ₂
7	73563	Serin in Aq. dest.
8	80376	Phosphoserin in CaCl ₂
9	80377	Serin in Calciumphosphat-Lsg.
10	80378	Phosphoserin in Calciumphosphat-Lsg.

Tabelle 4.16: Verworfenene ESI-MS Signale aus den Serin- und Phosphoserinproben

m/z	MS-#	Inhalt	Begründung
113	73562	Ser + CaCl ₂	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
131	73563, 73562, 80377	Ser in H ₂ O, Ser + CaP _i	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
163	73563, 73562	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
169	73562	Ser + CaCl ₂	Keine Zuordnung möglich
173	73531	P-Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
196	73531	P-Ser in H ₂ O	keine Korrelation mit Probe, keine Ionenzuordnung
214	73563	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
216	73531	P-Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
219	73563, 73562	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
241	80376, 80377	P-Ser + CaCl ₂ , Ser+ CaP _i	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
243	73562	Ser CaCl ₂	schwache Signale vor Einspritzen der Probe detektiert, keine Zuordnung eines Ionenkomplexes, vermutlich Hintergrund
257	73563, 73562	Ser in H ₂ O	keine Korrelation mit Probe
268	73563, 73562	Ser in H ₂ O	keine Korrelation mit Probe
279	73531, 73563, 73562, 80376, 80378	Ser in H ₂ O, PS aq.d., PS CaCl ₂ , PS+CaP _i	Vor einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
287	73562	Ser in H ₂ O	keine Korrelation mit Probe

Fortsetzung nächste Seite ...

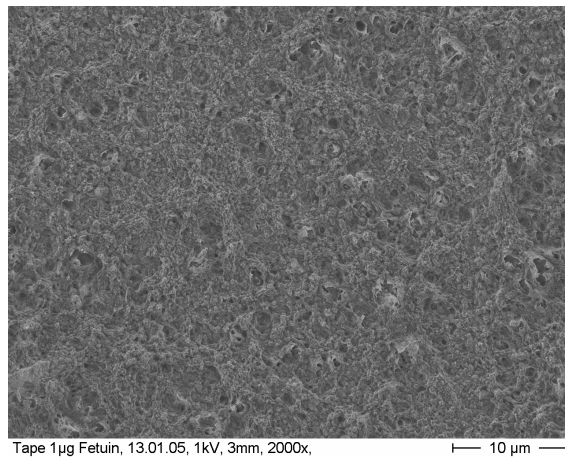
m/z	MS-#	Inhalt	Begründung
290	73531, 73563, 73562, 80376, 80378	P-Ser & Ser in H ₂ O, P-Ser & CaCl ₂ , PS CaP _i	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
296	73531, 73563, 73562, 80376	P-Ser & Ser in H ₂ O, PS CaCl ₂	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
305	73563,	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
307	73562		
321	73563	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
323	73563	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
326	73531, 73562, 73563	Ser & P-Ser in H ₂ O, Ser CaCl ₂	keine Korrelation mit Probe
344,	73563,	P-Ser in aq.dd. &	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
345	73562, 80376	CaCl ₂	
348	73563, 80376	Ser in H ₂ O, PS CaCl ₂	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
353	73563	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
358	73563, 73562	Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
376	73531, 80376, 80378	P-Ser in H ₂ O, P-Ser CaCl ₂ , PS CaP _i	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
381	73531, 73562, 80376	P-Ser in H ₂ O, P-Ser CaCl ₂	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
391	73563, 73531, 73562, 80376, 80377	Ser in H ₂ O, P-Ser in H ₂ O, P-Ser CaCl ₂ , Ser CaP _i	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
397	73563	Ser in H ₂ O	Erscheint in In RUN 73531, vor dem ersten Einspritzen der Serin Proben.
420	73531, 73562	P-Ser in H ₂ O	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
430	73563	Ser in H ₂ O	Keine Korrelation mit eingespritzter Probe
484	73562	Ser CaCl ₂	Vor Einspritzen deutliches Signal, keine Korrelation mit Probe
485	73563	Ser in H ₂ O	kein P-Ser Signal bei m/z 186 also kein P-Ser vorh. also kein Komplex mit P-Ser sondern andere Moleküle, durchgehende Linie, schon vor Einspritzen der Probe vorhanden; möglicherweise: 2x P-Ser + 3x Ca ²⁺
491	73563	Ser in H ₂ O	möglicherweise: 2x (P-Ser + Ca ²⁺ + Na ⁺)

Osteocalcin

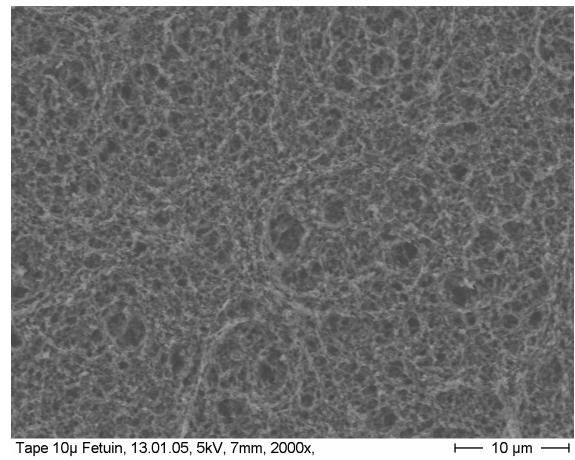
Tabelle 4.17: Aminosäuren von Osteocalcin bei pH 3. As: Aminosäure; M.: Masse; P.: Protein; Q: Ladung; Di-S: Disulfid Bindung; Bindungsstelle zu Calcium: ... Ca^{2+} [58, 103, 44]

	As	M. in P. [Da]	pKs (COOH)	pKs (NH ₂)	pKs (As Rest)	As Rest	Q (pH 3)	Struktur
1	Tyr	162	2,15	9,12				N-Terminus
2	Leu	113	2,36	9,6				
3	Asp	115	1,99	9,9	3,9	β -COOH		
4	His	138	1,8	9,07	5,99	Im	1	
5	Trp	186	2,38	9,39				
6	Leu	113	2,36	9,6				
7	Gly	57	2,34	9,6				
8	Ala	71	2,35	9,87				
9	Pro	97	1,99	10,6				
10	Ala	71	2,35	9,87				
11	Pro	97	1,99	10,6				
12	Tyr	163	2,2	9,11	10,11	OH		
13	Pro	97	1,99	10,6				
14	Asp	115	1,99	9,9	3,9	β -COOH		
15	Pro	97	1,99	10,6				
16	Leu	113	2,36	9,6				
17	Gla	174	2,19	9,67	4	γ -COOH		<div> <div>... Ca^{2+}</div> <div>1.Helix</div> <div>... Ca^{2+}</div> <div>Di-S zu 29</div> <div>... Ca^{2+}</div> </div>
18	Pro	97	1,99	10,6				
19	Lys	129	2,2	8,9	10,28	ϵ -NH ₂	1	
20	Arg	157	1,82	8,99	12,48	Guanidin	1	
21	Gla	174	2,19	9,67	4	γ -COOH		<div> <div>2.Helix</div> <div>... Ca^{2+}</div> <div>Di-S zu 23</div> <div>... Ca^{2+}</div> </div>
22	Val	99	2,32	9,62				
23	Cys	102	1,92	10,78	8,33	SH		
24	Gla	174	2,19	9,67	4	γ -COOH		
25	Leu	113	2,36	9,6				<div> <div>β-Turn</div> <div>Di-S zu 23</div> <div>... Ca^{2+}</div> <div>... Ca^{2+}</div> <div>2.Helix</div> <div>... Ca^{2+}</div> </div>
26	Asn	114	2,1	8,84				
27	Pro	97	1,99	10,6				
28	Asp	115	1,99	9,9	3,9	β -COOH		
29	Cys	102	1,92	10,78	8,33	SH		<div> <div>β-Turn</div> <div>3.Helix</div> </div>
30	Asp	115	1,99	9,9	3,9	β -COOH		
31	Glu	129	2,19	9,67	4,25			
32	Leu	113	2,36	9,6				
33	Ala	71	2,35	9,87				<div> <div>... Ca^{2+}</div> </div>
34	Asp	115	1,99	9,9	3,9	β -COOH		
35	His	138	1,8	9,07	5,99	Im	1	
36	Ile	113	2,26	9,62				
37	Gly	57	2,34	9,6				<div> <div>β-Turn</div> </div>
38	Phe	147	1,83	9,13				
39	Gln	128	2,17	9,13				
40	Glu	129	2,19	9,67	4,25			
41	Ala	71	2,35	9,87				<div> <div>3.Helix</div> </div>
42	Tyr	163	2,15	9,12				
43	Arg	157	1,82	8,99	12,48	Guanidin	1	
44	Arg	157	1,82	8,99	12,48	Guanidin	1	
45	Phe	147	1,83	9,13				<div> <div></div> </div>
46	Tyr	163	2,15	9,12				
47	Gly	57	2,34	9,6				
48	Pro	97	1,99	10,6				
49	Val	116	2,32	9,62		OH		C-Terminus
Masse [Da]:		5835			Ladung Ges.:		6	

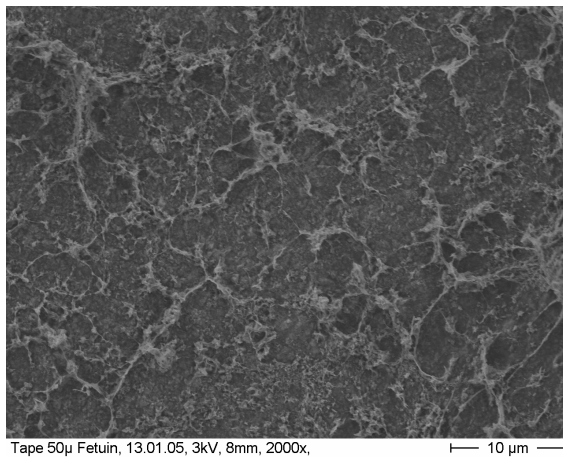
Fetuin



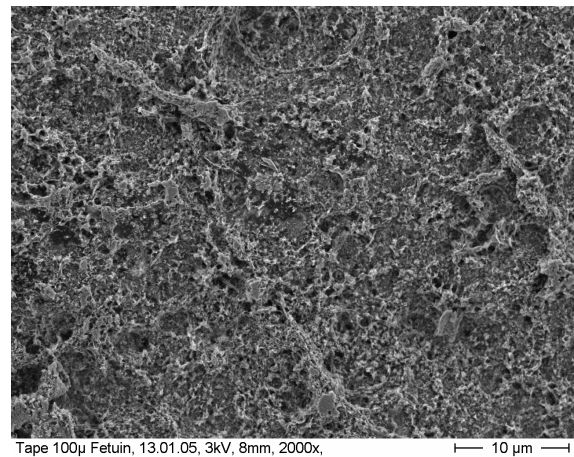
(a) 1 µg Fetuin



(b) 10 µg Fetuin

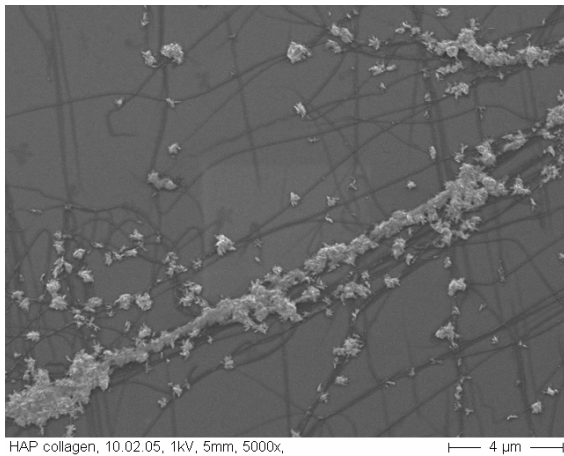


(c) 50 µg Fetuin

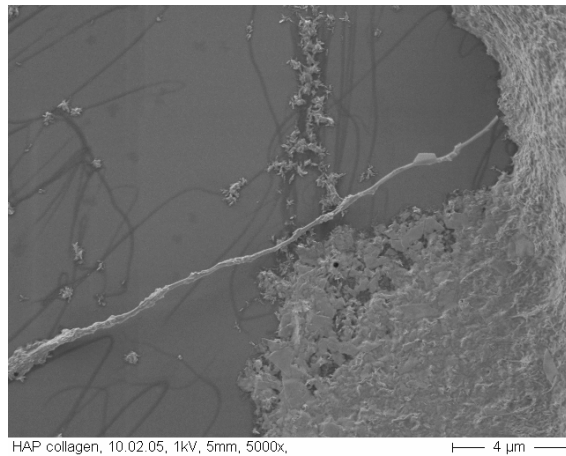


(d) 100 µg Fetuin

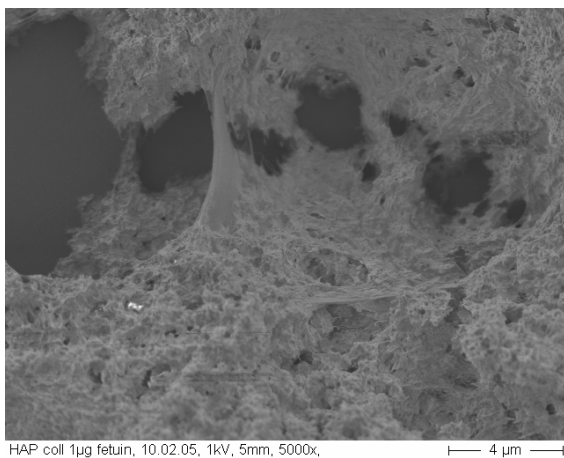
Abbildung 4.7: **Tape**, glatte Seite mit verschiedenen Mengen Fetuin pro 1 g Tape: (a) 1 µg Fetuin; (b) 10 µg Fetuin; (c) 50 µg Fetuin; und (d) 100 µg Fetuin. Es handelt sich um die Rückseite der Tapes von Abbildung 3.28, Seite 96.



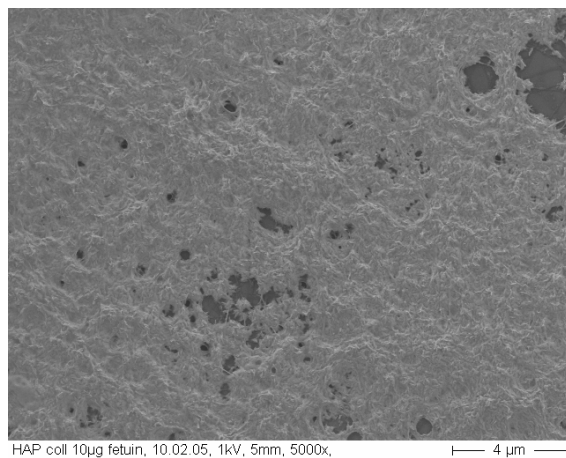
(a) ohne Fetuin



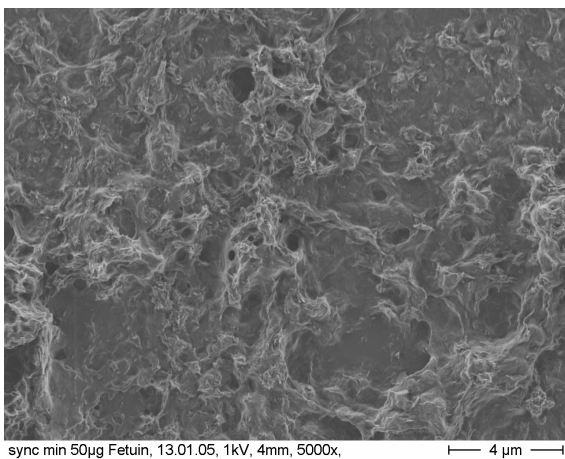
(b) ohne Fetuin



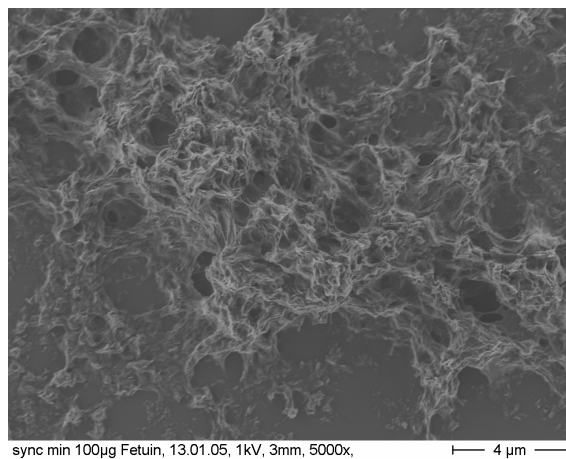
(c) 1 µg Fetuin



(d) 10 µg Fetuin



(e) 50 µg Fetuin

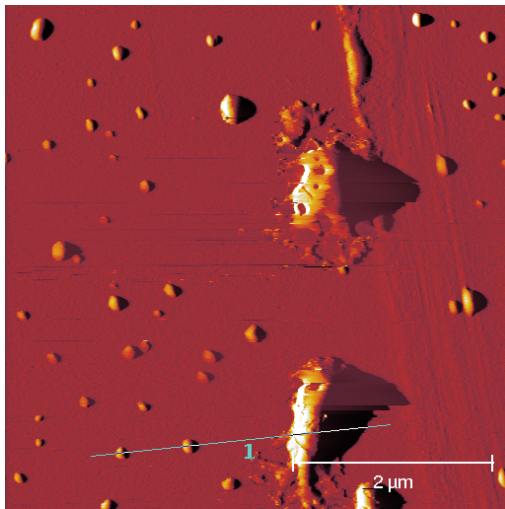


(f) 100 µg Fetuin

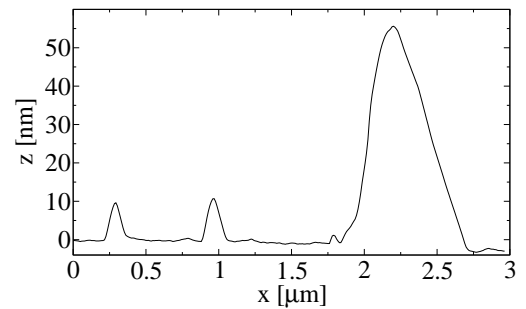
Abbildung 4.8: Synchrone Mineralisation von Kollagen mit Calciumphosphat und verschiedenen Mengen Fetuin pro 1 g Probe: (a) ohne Fetuin; (b) ohne Fetuin; (c) 1 µg Fetuin; (d) 10 µg Fetuin; (e) 50 µg Fetuin; und (f) 100 µg Fetuin. Mit steigendem Fetuingehalt sind immer weniger Kristallite zu erkennen.

Phospholipide nicht als Vesikel

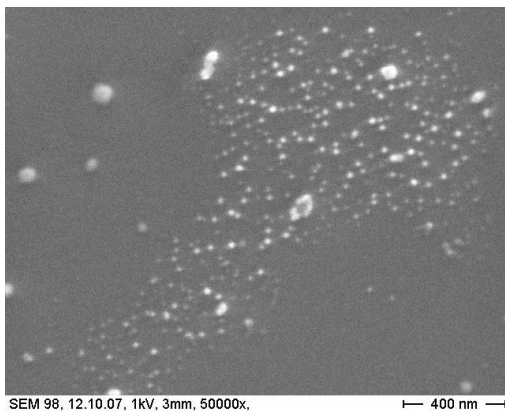
Zum Vergleich mit den Vesikeln wurden Phospholipidproben direkt aus einer Chloroformlösung präpariert, ohne die in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Arbeitsschritte, die der Präparation der Vesikel dienen, durchzuführen. Hierfür wurde für die REM und AFM Abbildungen eine Chloroformlösung (15 μg DPPC in 1500 μl Chloroform) auf einen gereinigten Si-Wafer gegeben, eingetrocknet und im Gerät abgebildet. Die TEM Probe wurde aus der Lösung heraus wie in Abschnitt 2.7 beschrieben präpariert. Die auf diese Weise hergestellten sichtbaren Objekte unterscheiden sich von den Vesikeln durch ihre geringere Größe (ca. 10 nm \varnothing). Die wenigen Objekte, die mehr als 1 μm \varnothing aufweisen zeigen keine Dellen, wie dies oft bei Vesikeln zu sehen ist, und sind vermutlich nicht hohl.



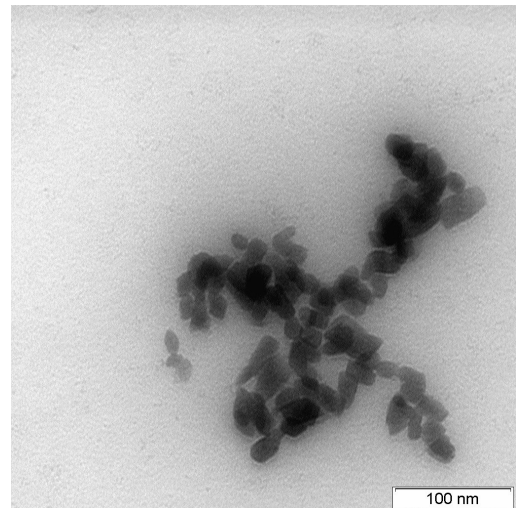
(a) AFM



(b) Profil 1 der AFM Abbildung links



(c) SEM



(d) TEM

Abbildung 4.9: Phospholipide direkt aus Chloroformlösung

EDX Spektren von Vesikeln

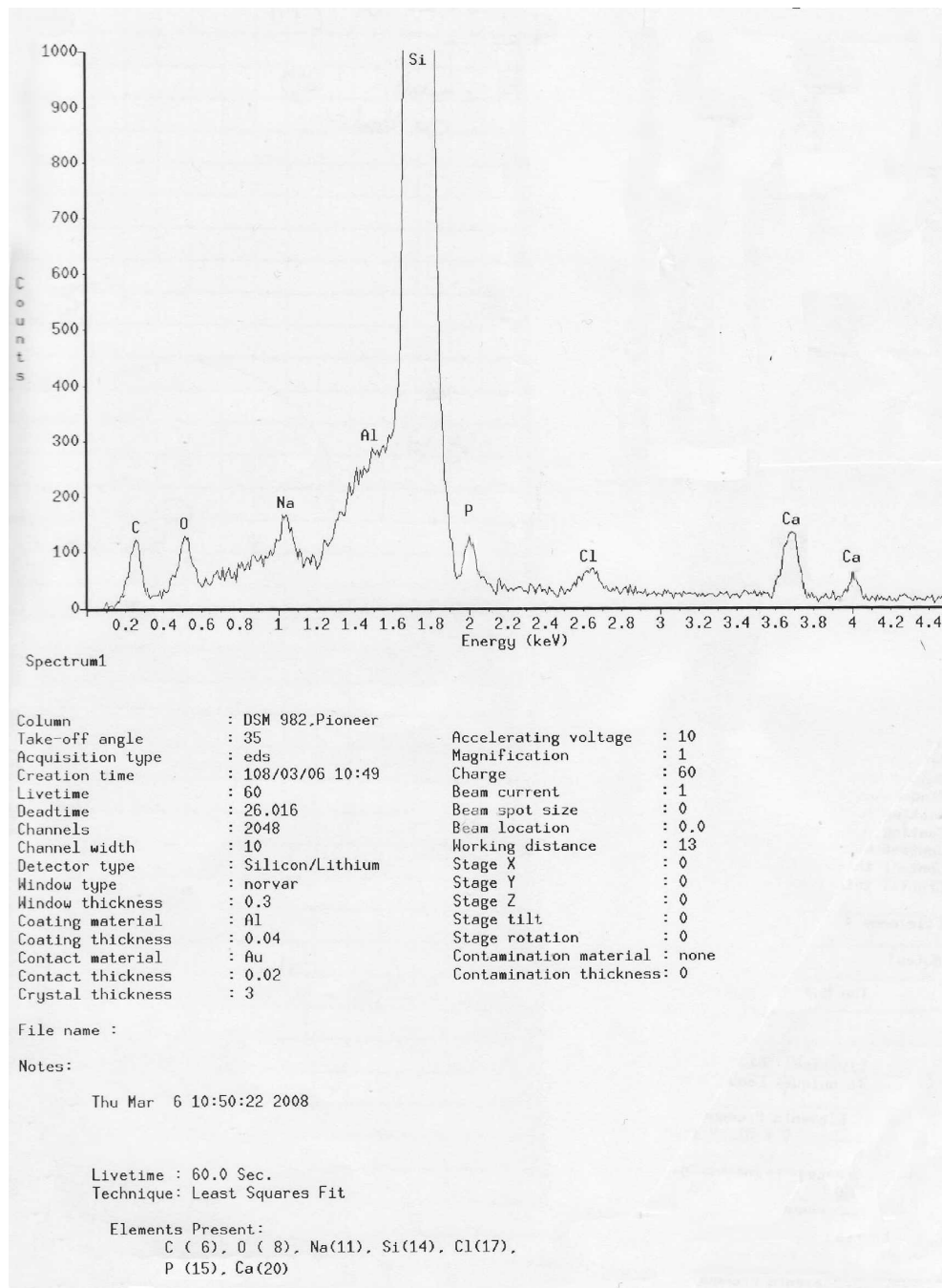


Abbildung 4.10: EDX von Vesikel mit Calciumphosphat

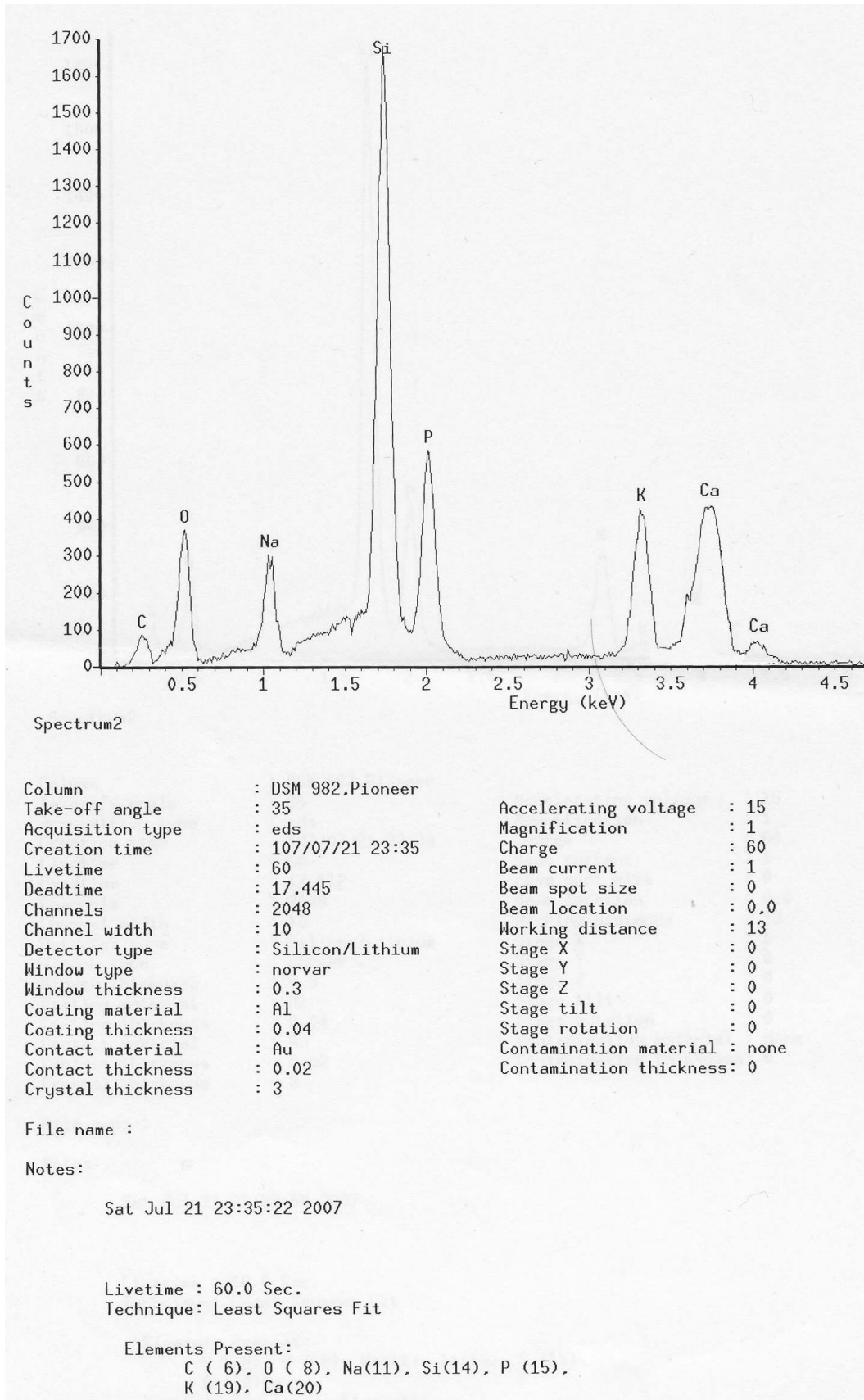


Abbildung 4.11: EDX von Vesikel mit Calciumphosphat und Phosphoserin

Glossar

6-31G** Großes Basisset für *ab initio* Modelierungen. Dieses Basisset liefert gute Ergebnisse, benötigt aber viel Computerressourcen. Benennung: Anzahl der Funktionen für die Valenzorbitale der gegebenen Schale: K = 6, L = 3 und M = 1 (G=Gaussfunktion). Der erste Stern (*) steht für zusätzliche d-Typ Funktionen bei schweren Atomen, der zweite Stern (**) steht für zusätzliche p-Typ Funktionen bei H und He [95, 92, 88]. Seite: 22, 44

AAS Atom Absorptionsspektroskopie. Elementspezifisches Licht wird in einer Flame emittiert, die Probe wird in diese Flame zerstäubt, und absorbiert das Licht, falls das Element in der Probe vorhanden ist. Die Menge des absorbierten Lichts ist proportional zu der Konzentration des gesuchten Elements in Probe. Seite: 24

ab initio Methode zu Berechnung von Atom- und Molekülmodellen, bei der die Elektronen und Atome als Wellenfunktion berechnet werden. Seite: 7, 20, 175, 180, 181, 184, 185

ACN Acetonitril: auch: Methylcyanid, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$, organisches Lösungsmittel, Molare Masse: 41,05 g/mol, CAS-Nummer: 75-05-8. Seite: 31

AFM Atomkraftmikroskop (*engl.: atomic force microscope*), auch SPM (*engl.: scanning probe microscope*). In dieser Arbeit verwendetes Gerät: Nanoscope IIIa, Digital Instrumens. Funktionsweise: Eine Spitze an einem Ausleger (siehe **AFM-Spitzen**) wird über die Oberfläche einer Probe gerastert und durch die Morphologie der Probe vertikal ausgelenkt. Diese Auslenkung wird durch einen Laser gemessen, der erst auf der Nadel reflektiert und je nach Auslenkung der Nadel auf einen unterschiedlichen Punkt in einem Sensor auftrifft. Man erhält so einen topographischen Eindruck der Probenoberfläche. Ausser der Topographie können auch elektromagnetische, chemische oder elementspezifische Eigenschaften in Abhängigkeit von Ort gemessen werden und verschiedene Datentypen aus einer Messung aufgenommen werden (siehe **AFM-Datentyp**). Seite: III, 35, 177, 178

AFM-Spitzen Eine AFM-Spitze (*engl.: tips oder probes*) ist für ca. 1-10 h Laufzeit geeignet. Die Spezifikationen der verwendeten Spitzen sind je nach verwendeten Betriebsmodus unter **tapping mode**TM und **contact mode** zu finden. Seite: 35, 36, 175, 178

AFM-Datentyp Verschiedene Datentypen werden bei einer AFM-Messung bereit gestellt. Höhe: die Höhe der Probe wird aus der Veränderung des Piezokristalls errechnet; Ableitung (*engl.: deflection*, nur **contact mode**): Differenz aus den oberen und unteren Signalen der Photodiode, mit diesen Daten können die Kanten von Objekten gut dargestellt werden. Die Amplitudendaten (nur **tapping mode**TM) geben die Änderung der Amplitude direkt wieder [91]. Seite: 35, 175

Agarose Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose, die glycosidisch miteinander verbunden sind. Zur Einbettung biologischer Proben zu Beginn der TEM Präparation (wird aus Rotalgen gewonnen), CAS-Nummer: 9012-36-6, Summenformel des Monomers: $C_{12}H_{18}O_9$. Seite: 34

Albumine Guppe globulärer Proteine im Blut und im Gewebe die unter anderem zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks dienen. Seite: 13

APCI (*engl.: atmospheric pressure chemical ionization*) chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Ionisierungsmethode in der Massenspektroskopie). Eine Lösung des Analyten wird durch eine Kapillare in einem Stickstoffstrom zerstäubt, wobei ein Spray entsteht. Das Spray wird durch eine beheizte Keramik (300-400°C) geführt, wo der Analyt durch Kollision mit einem Reaktanten ionisiert wird und das Lösungsmittel vollständig verdampft. Seite: III, 30

Basisset Eine Kombination aus unterschiedlich gewichteten Funktionen, die ein Orbital darstellen. Je mehr Funktionen verwendet werden, desto genauer wird die Berechnung und desto mehr Rechenzeit wird benötigt. Die so berechneten Orbitale können zu Atomorbitalen und Molekülorbitalen kombiniert werden (siehe LCAO). In dieser Arbeit wurde meist das STO-3G Basisset verwendet [112, (Hyperchem User Manual)]. Seite: 20, 44, 56, 175, 184, 186

Bio+/CHARMM Kraftfeld für molekularmechanische Berechnungen. Das BIO+ Kraftfeld von Hyperchem ist eine Implementierung des CHARMM (Chemistry at **HAR**vard **Macromolecular Mechanics**) Kraftfeldes, entwickelt in der Arbeitsgruppe von Martin Karplus [154]. Es gibt verschiedene Versionen dieses Kraftfeldes, hier ist das Parameterset *charmm27* realisiert. Es repräsentiert Bindung, Winkel, Torsion, Elektrostatik und Wasserstoffbrückenbindung und van der Waalskräfte. Seite: 20, 22, 23, 181

Bleicitrat Zum kontrastieren von TEM-Proben, Formel: $(C_6H_5O_7)_2Pb_3 \times 3 H_2O$; CAS-Nummer: 6107-83-1; Molekulargewicht: 1053,85; Sigma-Aldrich Produktnummer: 15326-25G. Seite: 35

BMP (*engl.: Bone Morphogenetic Proteins*), eine Gruppe von etwa 20 verschiedenen Wachstumsfaktoren und Cytokinen, die das Wachstum von Knochen und Knorpel fördern, Untergruppe der TGF- β -Familie. Seite: 14

Brushit Dicalciumphosphatdihydrat (DCPD), Kristallsystem: Monoklin; Elementarzelle: $a = 5,83 \text{ \AA}$, $b = 15,19 \text{ \AA}$, $c = 6,26 \text{ \AA}$; Winkel: $\beta = 116,47^\circ$. Formel: $Ca(HPO_4) \times 2 H_2O$; Löslichkeitsprodukt $[-\log(K_{sp})]$: 6,59; Stabilitätsbereich (pH) 2-6; Ca:P = 1. Seite: III, 10

Calcimycin Ionophor A23187; Carrier-Ionophor für bivalente Ionen, hochselektiv für Calcium. Da in diesem Ionophor das Ca^{2+} über Brücken zu Sauerstoff und Aminogruppen

komplexiert wird, werden auch Protonen sehr gut transportiert. Chemische Summenformel: $C_{29}H_{37}N_3O_6$, CAS-Nummer: 52665-69-7, Molekulargewicht: 523,62 g/mol, (Sigma Produktnummer C7522-1mg) [194, 157, 259]. Seite: 15, 27, 112, 180

contact mode Modus bei der Abbildung von Oberflächen im AFM bei dem die Spitze der Nadel permanent im Kontakt zur Probenoberfläche ist (im Gegensatz zu *tapping mode*TM). Spezifikationen der verwendeten Spitzen: BS-Cont-Al-10 von BudgetSensors (Innovative Solutions Bulgaria Ltd.), monolithische Si-Spitze, Ausleger: 450 μ m, Federhärte: 0,2 N/m, Frequenz: 13 kHz, Chipgröße: 3,4 x 1,6 x 0,3 mm, Spitzenhöhe: 17 μ m \pm 2 μ m, Rückseite Aluminiumbeschichtet. Seite: 36, 37, 175, 186

cutoff energy Beim der Molekularmodellierung werden Energien, die einen festgelegten Grenzwert unterschreiten und den Ausgang der Rechnungen nicht signifikant beeinflussen zur Vereinfachung ignoriert. Dieser Grenzwert wird *cutoff energy* genannt. Seite: 23

DLVO Die Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek Theorie besagt, dass die Stabilität eines kolloidalen Systems von den anziehenden v. d. Waalskräften und der abstoßenden Kraft elektrischen Doppelschicht um die Partikel bestimmt wird. Nur wenn die Partikel stark genug kollidieren, wird die Doppelschicht überwunden, und die Partikel adsorbieren irreversibel [238]. Seite: 57

DMSO Dimethylsulfat, organisches Lösungsmittel, chemische Formel: $CH_3-SO-CH_3$, Molekulargewicht: 78,13 g/mol, CAS Number: 67-68-5. Seite: 28

DPPE 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, kurz: DPPE. Biologisches auftreten vor allem als oberflächenbildendes Molekül in der Lunge, im Labor häufig zur Modellierung von Vesikeln verwendet. Phospholipid aus Lecitin-Phosphat-Glycerin-[C₁₅-Kette]₂, CAS-Nummer: 2644-64-6, Formel: $C_{40}H_{80}NO_8P$, Molekulargewicht: 734,04, Sigma-Aldrich Produktnummer: P5911-100MG. Seite: III, 15, 27, 112, 120

EDX *engl.: energy dispersive X-ray spectroscopy* Energiedispersive Röntgenspektroskopie: die von einer Probe emittierte Röntgenstrahlung für die Untersuchung der Elementzusammensetzung. Dazu werden die Atome in der Probe mit Hilfe eines Elektronenstrahls im REM angeregt, diese senden Röntgenstrahlung mit einer elementspezifischen Energie aus. Auf diese Weise können die in der Proben enthaltenen Elemente bestimmt werden. Seite: III, 32

Epiphysenfuge (*engl.: growth plate, epiphysial plate, physis*) Wachstumsbereich des Röhrenknochens. Ein knorpeliger Spalt im Knochen bei Kinder bis ca. 19 Jahre. Nach dem Einwandern von Osteoklasten wird dieser Spalt mineralisiert. Seite: 2, 12, 14

Epoxidharz zum Einbetten biologischer Proben mit nachfolgendem Anfertigen von Dünnschnitten. Science Services, München, Produktnummer 14300. Seite: 34, 40

10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	← Zielvolumen, ↓ Komponenten, Mengen in Gramm
6,5	13	19,5	26	NSA [g] (nonenyl succinic anhydride)
2,5	5	7,5	10	ERL [g] (Vinylcyclohexendioxid, Kettenstarter)
1,5	3	4,5	6	DER [g], (Polyglycoll-Diepoxyd)
0,1	0,2	0,3	0,4	S-1 [g] (auch dimethylaminoethanol kurz DMAE)

Electron Spray Ionization (*dt.: Elektronen - Zerstäuber Ionisation*, nur der englische Ausdruck ist gängig) In der ESI-MS werden die Proben wie folgend beschrieben ionisiert: (1) Die Probelösung kommt in eine Nadel an der eine hohe Spannung anliegt; (2) Beim aussprühen wird aus der Lösung ein Nebel mit an der Oberfläche elektrisch geladenen Tropfen; (3) Mit verdunsten der Lösung steigt die Ladungsdichte an der Oberfläche der Tropfen; (4) Erreicht die Ladungsdichte einen kritischen Wert (Rayleigh Stabilitätsgrenze) teilen sich die Tropfen da die Oberflächenspannung unter die elektrostatische Abstoßung fällt. Dieser Vorgang wiederholt sich viele Male, bis sehr kleine Tropfen entstanden sind; (5) Aus diesen sehr kleinen, stark geladenen Tropfen werden die zu messenden Moleküle/Ionenkomplexe, auf Grund der elektrostatischen Abstoßung, ausgeworfen. Verwendete Geräte: Bruker Esquire Ion Trap mit ESI/APCI Quelle . Seite: III, 16, 30, 31, 59, 101, 182

Ether Diethylether, organisches Lösungsmittel, hier zur Reinigung des phosphorylierten Serins verwendet, chemische Formel: $\text{C}_2\text{H}_5\text{-O-C}_2\text{H}_5$, CAS-Nummer: 60-29-7 Molare Masse: 74,12 g/mol. Seite: 26

Etidronate (1-Hydroxy-1-Phosphono-ethyl)phosphorsäure, kurz: HEDP (*engl.: etidronic acid*) ist ein Bisphosphat, das in Reinigungslösungen, zur Wasserbehandlung, in der Kosmetik und in der Pharmazie genutzt wird. Es ist ein maximal 4-wertiges Kation. Chemische Formel: $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_7\text{P}_2^{2-}$. Seite: 14

Fetuin Protein von 48-58 kDa, das die ektopische Mineralisierung in Säugetieren verhindert. Ausführliche Beschreibung Seite 13. Sigma-Aldrich, F-3004, Lot 113k. Seite: 5, 13

Flüssigzelle (*engl.: liquid cell*) Spezielle Halterung für die AFM-Spitzen, mit der die gesamte AFM-Messung in einem abgegrenzten Raum in Lösung stattfinden kann. Eine genaue Beschreibung einer Flüssigzelle ist bei *Hillner et al.* zu finden [101]. Seite: 36

FT-IR Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie. Licht aus dem Infrarotbereich (typischer Weise der Wellenlänge: $2,5\text{-}25\ \mu\text{m}$ = Wellenzahl: $4000\text{-}400\ \text{cm}^{-1}$) wird durch eine Probe gestrahlt und die Lichtabsorption in Abhängigkeit der jeweiligen Wellenlänge gemessen. Da bei chemischen Gruppen mit der thermischen Bewegung der Atome häufig gleichzeitig ein Dipol schwingt, adsorbieren diese bei einer bestimmten Frequenz das Licht. Die Anwesenheit einer Absorptionsbande im IR-Spektrum ist ein Hinweis auf die Anwesenheit einer bestimmten funktionellen Gruppe. Über Fourier-Transformation werden aus den mit Hilfe eines Interferometers (z. B. dem Michelson-Interferometer),

gemessenen Interferogrammen IR-Spektren berechnet. Als resultat erhält man ein Spektrum auf dem die Intensität des durchstrahlten Lichts gegen die Wellenlänge aufgetragen ist. In dieser Arbeit Verwendetes FT-IR-Spektrometer: Spectrum 2000, Perkin Elmer, Deutschland). Seite: III, 28

FT-ICR Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz. Bei dieser Method der zur Massenbestimmung werden die ionisierten Atome und Moleküle in einem homogeneen Magnetfeld auf eine Kreisbahnen gelenkt. Sie bewegen sich dann mit einer massenabhängigen Umlauffrequenz in dieser Ionenfalle (Cyclotron-Kreisfrequenz). Stimmen die Frequenz eines eingestrahnten Wechselfeldes mit der Cyclotronfrequenz der Ionenmasse überein, so tritt der Resonanzfall ein und der Cyclotronradius des betreffenden Ions vergrößert sich durch Aufnahme von Energie aus dem eingestrahnten Wechselfeld, bis der Analyt an einer Detektorplatte vorbei fliegt und registriert wird. Seite: 31

Glimmer hier Muskovit, Schichtsilikat mit negativ geladener Oberfläche, der Glimmer lässt sich mit einem Messer spalten und bietet dann eine glatte, saubere Oberfläche die sich als Träger für AFM-Proben eignet. Formel: $\text{KAl}_2[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2]$. Seite: 25, 35

Glutaraldehyd Glutaraldehyd, 50%ige Lösung in Wasser, Formel: $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, Molekulargewicht = 100,13 g/mol; Katalog Nummer: 23116, unter Argonatmosphäre abgefüllt, 10x 5 ml Ampullen, (Serva, Heidelberg, Deutschland) sort. Seite: 28, 34

Glykosaminoglykane kurz: GAG sind linear aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaute, saure Polysaccharide die glykosidisch mit einem Aminozucker verbunden sind. Seite: 4, 184

Grace Version 5.1.22, Programm zur Verarbeitung und Darstellung zweidimensionaler Daten, Entwickelt von *Weizmann Institute of Science* Rehovot, Israel; <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>. Seite: 28

HCCA α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (*engl.: α -cyano-4 hydroxy-cimannic acid*) meist als HCCA bezeichnet, verwendet als Matrix bei MALDI-TOF-MS versuchen. CAS-Nummer: 28166-41-8, Chemische Formel: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$, Molekulargewicht: 189,17 g/mol. Seite: 31, 181

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie *engl.: high performance liquid chromatographie*, Chromatographische Methode zur Trennung von Substanzen, indem die zu untersuchende Lösung durch eine Säule gespült wird, die die verschiedenen Komponenten unterschiedlich lange zurückhält. Seite: III, 30

Hydoxylapatit Calciumphosphat-Kristallphase, Formel: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, Löslichkeit $[-\log(K_{\text{SP}})]$: 116,8 bei pH 9,5-12 und 25°C; Ca:P = 1,67 [57]. Kristallsystem: Hexagonal, Kristallsystem: Monoklin $\text{P2}_1/\text{a}$;
Auch eine Variante mit weniger Calcium existiert: $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$.

Hier verwendetes HAp-Pulver: Merck, Darmstadt, Charakterisierung nach *Dittrich et al.* [53]: Oberfläche: 68,7 m²/g; Isoelektrischer Punkt: 7,8; Korngrösse [µm]: (d10) 0,9; (d50) 2,3; (d90) 4,8; Dichte: 2,91 g/m³. Seite: III, 72, 140, 183

Hydrindantin Hydrindantin Dihydrat zur Färbung von Phosphoserin, CAS-Nummer: 5950-69-6, Sigma-Aldrich Bestellnr.: H2003-5G, chemische Formel: C₁₈H₁₀O₆, Molekulargewicht: 322,27 g/mol. Seite: 28

ICDD (*engl.: International Centre of Diffraction Data*) Das ICDD stellt Datensätze bereit (PDF-Karten *engl.: powder diffraction file cards*), mit denen die eigene Messung verglichen werden kann. So wird eine schnelle Auswertung der Diffraktogramme realisiert. Seite: 41

in lens Sekundärelektronendetektor, als Ring oberhalb der Probe, ermöglicht durch geringen Arbeitsabstand auch bei niedrigen Beschleunigungsspannungen hoch aufgelöste Bilder, hat aber etwas weniger Kontrast als der normale, seitlich angebrachte Detektor. Seite: 32

in vitro lat. für im Glas. In einem Laborversuch wird ein Ausschnitt eines natürlichen Systems in einem Modellsystem analysiert, im Gegensatz zu *in vivo*. Seite: 3, 4, 180

Initial Guess Festlegen der Anfangsbedingungen und der Koeffizienten der Molekülorbitale bei *ab initio* Berechnungen. Diese sind für self consistent field Berechnungen nötig und werden durch lösen der Hartree-Fock-Roothaan Gleichung gegeben, wobei die Fock-Matrix durch das Kernhamiltonian ersetzt wird. Dies liefert meist gute Ergebnisse als Startbedingung. Seite: 23

in vivo Untersuchung in einem lebenden System (Körper/Zelle), im Gegensatz zu *in vitro*. Seite: 3, 4, 180

Ionophoren Moleküle, die das passieren von Ionen durch eine Phospholipidmembran erlauben. Hier wurden Calcimycin und Valinomycin verwendet. Der innere Teil der Ionophoren besteht aus polaren Gruppen mit tetra- oder oktagonaler Geometrie, die ein bestimmtes Ion besonders gut binden kann. Das geladenen Ion wird von dem inneren hydrophoben Anteil der Membran abgeschirmt, und kann so die Phospholipiddoppelmembran durchdringen. Die elektrochemische Aktivität wird ausgeglichen (die Gleichgewichte folgen der Nernst-Gleichung). Sind mehr als eine Ionenspezies involviert, kann der Ionenfluss mit der Goldman Gleichung berechnet werden, in der die ionophoreninduzierte Permeabilität als Faktor eingeführt wird [194]. Seite: 15, 27, 176, 188

Knockout-Maus bei einer Knockout Maus wurden ein oder mehrere Gene deaktiviert, der Wildtyp ist im Gegensatz dazu ein Tier mit dem natürlichen Genom. Seite: 12, 14

Kollagen Typ I aus Kalbshaut von IBFB GmbH Leipzig, Lot: 050713, lyophilisiert. Ausführliche Beschreibung ab Seite 11. Seite: 29

Konvergenzlimit Konvergenzkriterien bei *ab initio* Berechnungen (*engl.: convergence limit*).

Mit dem Konvergenzlimit und der Schrittbegrenzung wird die Genauigkeit der Berechnung gegeben. Das Konvergenzlimit bezieht sich auf die Energiedifferenz zwischen zwei self consistent field Zyklen. Die Schrittbegrenzung gibt die maximale Anzahl der Zyklen an, die erlaubt sind. Seite: 23

kritische Keimgrösse Ab der kritischen Keimgrösse ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein weiteres Ion an ein Ionenkuster anlagert grösser als die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ion aus dem Kuster in die Lösung diffundiert → das Kuster wächst. Seite: 8, 183

LCAO (*engl.: linear combination of atomic orbitals*) Addition der atomaren Wellenfunktionen um das Molekülorbital Ψ_i zu erhalten: $\Psi_i = \sum C_{\mu i} \phi_i$ mit ϕ_i als Atomorbital und $C_{\mu i}$ als Wichtungsfaktor. Seite: 176

Leidenfrost Effekt von Johann Gottlob Leidenfrost beschriebener Effekt der verzögerten Phasenumwandlung, bei dem eine isolierende Gasschicht den Wärmeaustausch verhindert. Beschrieben in der Schrift *De Aquae Communis Nonnullis Qualitatibus Tractatus*, 1756 (auf antiken Erkenntnissen basierend). Seite: 25

MALDI-TOF-MS Matrix unterstützte Laser absorptions Ionisations-Flugzeit-Massenspektroskopie (*engl.: matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry*). Die zu untersuchende Substanz wird mit einer Matrixsubstanz (z.B. HCCA oder TFA) auf einen Probenträger getropft, eingetrocknet und durch einen Laserimpuls vaporisiert. Die Matrix dient als Protonendonator und adsorbiert die Laserenergie weshalb die Probe verdampft und eine Wolke aus Substanz und Matrixmolekülen entsteht. Die geladenen Teilchen der Wolke werden in einem elektrischen Feld beschleunigt, und die Flugzeit gemessen (*engl.: ToF= time of flight*). Diese ist proportional zum Gewicht der Moleküle, dem Beschleunigungsfeld und der Ladung der Moleküle [274]. Verwendetes Gerät: Biflex IV MALDI-TOF von Bruker Daltonics. Seite: III, 31, 101, 179, 187

Molekularmechanik Bei der Molekularmechanik werden die Gesetze der klassischen Mechanik auf Atome und Moleküle angewandt. Die verschiedenen Kräfte zwischen den Atomen werden durch Federn repräsentiert, (im Gegensatz zu semiempirischen oder *ab initio* Methoden) und gegebenenfalls über Korrekturfaktoren in der Federhärte angepasst. Einen Satz aus Federn nennt man Kraftfeld. Hier verwendetes Kraftfeld: Bio+/CHARMM. Seite: 20, 23, 176

MP2 *engl.: second order Møller Plesset*. Berücksichtigung der Interaktion der Elektronen. Aufbauend auf einer HF-Rechnung wird eine verbesserte Beschreibung erreicht, indem die HF-inhärenten Approximationen störungstheoretisch korrigiert werden. Seite: III, 20, 21, 23

Mulliken-Ladungen Das Konzept der Mulliken-Ladungen beruht auf den Ladungsdichten, die man aus den quadrierten Wellenfunktionen erhält. Hat man zum Beispiel ein

Molekülorbital (MO), das aus zwei Atomorbitalen (AO) linearkombiniert ist $\Psi = c_1\varphi_1 + c_2\varphi_2$ so erhält man die Elektronendichte durch Quadrieren: $\Psi^2 = c_1^2\varphi_1^2 + c_2^2\varphi_2^2 + 2c_1c_2\varphi_1\varphi_2$. Mulliken hat nun vorgeschlagen, diese Terme wie folgt zu deuten: Der erste Summand stellt den Beitrag des Orbitals φ_1 zur Elektronendichte am Kern 1 dar, der zweite Summand entsprechend den Beitrag des Orbitals φ_2 zur Elektronendichte am Kern 2, während der dritte Summand den Beitrag beider Orbitale zur Elektronendichte der Bindung darstellt. Da man im Normalfall jedoch nur mit Partialladungen der Atome arbeitet geht man im allgemeinen so vor, dass man die Elektronendichte der Bindung zwischen den beteiligten Atomorbitalen gleichmäßig aufteilt. So kommt man dann zu Partialladungen, aus denen das Dipolmoment berechnet werden kann [153] . Seite: 20, 44, 46

Nafion ist ein sulfoniertes Tetrafluorethylen-Polymer (PTFE), eine Modifikation von Teflon. Durch die Addition der stark sauren Sulfonsäuregruppen hat es eine stark negative Oberfläche [107]. Seite: 98, 100

Nernst'sche Diffusionsschicht (*engl.: nernst diffusion layer*). Die Nernst'sche Diffusionsschicht ist die Diffusionsschicht, innerhalb derer ein Konzentrationsgefälle von c_0 bis c_x besteht (c_0 ist die Konzentration in der Lösung, c_x die Konzentration am Festkörper, z. B. Kristall oder einer stromdurchflossenen Elektrode). Die Nernst'sche Diffusionsschicht wird um so kleiner, je stärker man rührt. Der Diffusionsstrom steigt entsprechend an. Der Konzentrationsverlauf in der Nernst'schen Diffusionsschicht ist in der idealisierten Vorstellung linear. Ohne Rührung (und ohne Schwerkraft) wüchse die Diffusionsschicht in die Lösung hinein. Seite: 10, 98

Ninhydrin zur Färbung von Phosphoserin, CAS-Nummer: 485-47-2; chemische Formel: $C_9H_6O_4$, Molekulargewicht: 178,15 g/mol, Sigma Produktnummer: N4876-100G. Seite: 28

NMR Kernspinresonanzspektroskopie (*engl.: nuclear magnetic resonance*). Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome durch hochfrequente Magnetfelder. Je nach der Umgebung des angesprochenen Atoms erhält man ein leicht unterschiedliches Resonanzsignal und kann so Rückschlüsse auf die elektronische Umgebung ziehen (z. B. Bindungselektronen \rightarrow Atomabstand) Dabei sind nur Isotope mit einer ungeraden Nukleonen- oder Ordnungszahl einer NMR-spektroskopischen Untersuchung zugänglich.. Seite: III, 16

NSI Nanospray Ionisation (*engl. nanospray ionization*) die NSI ist eine Form der **Electron Spray Ionization**, nur dass der Analyt aus einer sehr dünnen Nadel versprüht wird. Dies hat sehr geringe Durchflussraten von ca. 25 nL/min zur Folge, somit werden auch nur kleine Probenmengen benötigt (ca. 0,5 μ l) [262]. Auch werden kleine Lösungsmengen leichter vernebelt und Ionenkomplexe bleiben eher erhalten. Verwendetes Gerät für

Massenspektren mit Osteocalcin: Hybrid NSI IIT FTICR MS (Finnigan LTQ FTMS, Thermo Electron Co., Bremen). Seite: 31

Nukleation Keimbildung, Phasenübergang erster Ordnung, Überwindung der kinetischen Hemmung über die kritische Keimgröße hinaus. Homogene Nukleation: ohne Einwirkung phasenfremder Teilchen. Heterogene Nukleation: Fremdmaterial ist an der Keimbildung beteiligt. Seite: 7, 44

Oberfläche eines Moleküls Die Berechnung der Oberfläche (solvent-accessible or Van der Waals) wurde nach der Gittermethode (grid method) nach *Bodor et al.* berechnet und hat einen Fehler kleiner 10% [22]. Sie basiert auf den Atomradii von *Gavezzotti et al.*[80]. Seite: 21, 48, 55, 137

Octacalciumphosphat Häufiges Zwischenprodukt bei der Umwandlung von amorphem Calciumphosphat zu Hydroxylapatit, trotz des anderen Kristallsystems sehr hohe Übereinstimmung des Kristallgitters zu dem von HAp [38]. Kristallsystem: triklin, $P\bar{1}$, Elementarzelle [in Å und °]: $a = 19,69$; $b = 9,52$; $c = 6,835$; Dichte=2,61 g/cm³; Eigenschaften [57]: Formel: $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; Löslichkeitsprodukt $[-\log(K_{sp})]$: 96,6; Stabilitätsbereich (pH) 5,5-7; Ca:P = 1,33. Seite: III

Orthophosphorsäure Orthophosphorsäure, hier zum phosphorylieren von Serin verwendet, CAS-Nummer: 7664-38-2, Sigma-Aldrich Produktnummer: 79622-100G, 99%ig wasserfrei, stark hygroskopisch. Seite: 26

Osmiumtetroxyd OsO_4 , Kontrastmittel für organische Proben in der Elektronenmikroskopie, Roth, Karlsruhe, Deutschland. Seite: 34

Osteocalcin auch : Bone-Gla-Protein, BGP. Molekulargewicht: 5834,4 g/mol, Summenformel: $\text{C}_{263}\text{H}_{372}\text{N}_{66}\text{O}_{82}\text{S}_2$, ausführliche Beschreibung ab Seite 12, Auflistung der Aminosäuren auf Seite 168. Bezogen über: Calbiochem, Produktnummer: 499050 (100 µg, Konz.: 3,2 mg/ml in 10 mM NaPO_4 , 75 mM NaCl, pH 7,4; Reinheit SDS-Page > 98%, Lot # B56737), und Biomol, USBio Produktnummer: O8060-11 (aus bovinem Knochen, in Lösung, in 50% glycerol, highly purified (> 98% by SDS-PAGE). No contaminants detected. Single band by SDS-PAGE, IEP, and/or RID). Seite: III, 31

Osteon Ein Osteon (*griech.: osteo* „Knochen“; auch Havers-System nach Clopton Havers) ist die funktionelle Grundeinheit der Kortikalis (Substantia compacta) eines Röhrenknochens. Ein Osteon besteht aus einem zentralen Kanal, der zwei Blutgefäße, die Havers-Gefäße enthält. Um diesen Kanal sind konzentrische Knochenlamellen angeordnet. Diese Lamellen bestehen aus Knochenzellen (Osteozyten) und der sie umgebenden Grundsubstanz (größtenteils Kollagen und Calciumphosphat). Seite: 2

Parafilm dehnbare, weich durchscheinende Verschlussfolie aus Paraffin-Wachs und Polyolefin (Polyethen), geringe Gas- und Wasserdampfdurchlässigkeit. Seite: 35

parakristallin Die Theorie des Parakristalls ist die Annahme von Gitterzellen, die in charakteristischer Weise verwackelt sind und das Ziel ist aus den Beugungsbildern statistische Aussagen über den Gitteraufbau zu machen [106]. Seite: 9, 12

Phosphorpentoxyd äußerst hygroskopisches weißes Pulver, das mit Wasser in stark exothermer Reaktion zu Phosphorsäure umgesetzt wird, hier zum phosphorylieren von Serin verwendet. Formel: P_4O_{10} , CAS-Nummer: 1314-56-3, Sigma-Aldrich Produktnummer: 431419-50G. Seite: 26

Phosphoserin O-Phospho-L-serin, O = ortho, L = linksdrehend, phosphorylierte Form von Serin, ausführliche Beschreibung ab Seite 10. Chemische Summenformel: $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_6\text{P}$, Molekulargewicht: 185,07, CAS-Nummer: 407-41-0, Sigma-Aldrich Produktnummer: P0878-5G. Seite: III

Projected Hückel Variante zum Start einer *ab initio* Molekülberechnung. HyperChem führt eine empirische Hückel Berechnung durch, um die Koeffizienten des Molekülorbitals zu erzeugen. Diese sind für ein minimales Basisset gültig und werden auf das verwendete Basis Set projiziert. Seite: 23

Proteoglycanmatrix Zuckermoleküle, die an Proteinketten gebunden sind. Hier findet häufig Mineralisierung statt. Seite: 2

Proteoglykane wichtiger Bestandteil der Extrazellulären Matrix, auch an der Zelloberfläche und in intrazellulären sekretorischen Granula lokalisiert. Proteoglykane bilden eine Klasse von besonders stark glykosylierten Glykoproteinen (Makromoleküle, die aus einem Protein und einer oder mehreren kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen bestehen). Seite: 5

Pyrophosphat auch Diphosphat, Summenformel $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$ (Abkürzung PP_a ; *engl.*: PP_i), wird auch als Salz der Pyrophosphorsäure bezeichnet. Es entsteht z. B. durch Kondensation aus zwei Phosphatmolekülen. Seite: 4

REM Rasterelektronenmikroskop, verwendetes Gerät: Zeiss Gemini 292, FEG (*engl.*: *field emission gun*) mit . Seite: III, 177

REPT NMR-Messverfahren, bei dem die Anregung eines Kerns über einen Anderen erfolgt. Die Nachbarschaft von Kernen kann so nachgewiesen werden (*engl.*: *recoupled polarization transfer NMR*). Seite: 69–71

SAXS *engl.*: *small angle x-ray scattering*. Bei der *dt.*: *kleinwinkel Röntgenstreuung* werden Röntgenstrahlen ($\lambda = 0,1\text{--}0,2\text{ nm}$) elastisch von einer Probe mit Inhomogenitäten im nm Bereich gestreut. Gemessen werden sehr kleine Winkel, typischer Weise zwischen $0,1^\circ$ und 10° . In diesem Winkelbereich können Informationen über die Form und Größe und typische Abstände teilweise geordneter Materialien gewonnen werden. Durch SAXS

können Strukturinformationen von Makromolekülen zwischen 5 und 25 nm, bei teilweise geordneten Systemen bis zu 150 nm gewonnen werden. Als Ergebnis erhält man 2d (Winkel gegen Intensität) oder 3d (Winkel-Winkel Intensität, „konzentrische Kreise“) Diagramme. Seite: III, 2

SBF simulierte Körperflüssigkeit (*engl.: simulated body fluid*), Lösung, deren Ionenkonzentrationen etwa der des humanen Blutplasmas gleicht. Es gibt viele verschiedene Versionen von SBF, die Konzentrationen des häufig verwendeten standard SBF [mM]: Na^+ 142,0; K^+ 5,0; Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,5; Cl^- 147,8; HCO_3^- 4,2; HPO_4^{2-} 1,0; SO_4^{2-} 0,5; pH 7,40; TRIS 50,0 mM [55]. Seite: III, 8

Scaffold dt.: Gerüst, hier: fester, nicht mit Zellen besiedelter Anteil eines Organs. Seite: 30

Schritt Algorithmus Algorithmus zum Auffinden der Richtung und der Schrittweite zur Bewegung der Atome bei der geometrischen Optimierung von Molekülen. In dieser Arbeit wurde (nach kurzen experimenten mit der *steepest decent* Methode) ausschliesslich die *Polak-Ribiere* Methode verwendet. Diese ist eine Implementierung eines *conjugate gradient* Algorithmuses, bei dem der aktuelle Gradient aus einer *single point calculation* und die Richtung des vorhergehenden Schritts kombiniert werden, um die Richtung und die Schrittweite für die Bewegung der Atome festzulegen [112, Anleitung (Manual),]. Seite: 23

self consistent field Die Berechnung erfolgt in zwei Schritten: 1. Hamiltonian energiematrix wird berechnet. 2. LCAO Koeffizienten werden bestimmt. Ändern sich die Koeffizienten nicht mehr, gilt das Feld als selbstkonsistent. Seite: 23, 180, 181

semiempierisch Ein quantenmechanischer Ausdruck zusammen mit Parametern ersetzt die Berechnung eines Atoms. Nur die Valenzelektronen werden explizit berücksichtigt. Auch wird ein Großteil der rechenzeitaufwendigen Mehrzentrenintegrale nicht explizit berechnet, sondern an experimentellen Daten parametrisiert. Seite: 20, 181

Serin ^{13}C - ^{15}N ^{13}C - ^{15}N markiertes Serin der Firma Eurisotop, Frankreich L-Serine-N-fmoc (U-13C3, 97-99%; 15N, 97-99%) CNLM-8403-1 1 G, Entry ID 4186712, Catalog Reference CNLM-8403 Spectra ref 548SERF. Seite: III, 26

Si-Waver Ein Silizium Einkristall zu einem 2 x 5 x 5 mm großem Plättchen geschnitten. Die Oberfläche ist bis auf atomare Ebene glatt. Plano GmbH Wetzlar, Bestellnummer G3390. Seite: III, 25, 28, 32, 35, 36

simulierte IR-Spektren Bei der Berechnung von IR-Spektren wurde von energetisch optimierten Molekülen und Komplexen ausgegangen. Die bei einer Vibration wirkenden Kräfte wurden aus einer vorhergehenden *ab initio single point* Berechnung entnommen. Die Bewegung der Atome, die aus diesen Kräften resultieren, werden mit der klassische Mechanik beschrieben. Ruft das Licht einer bestimmten Frequenz ν einen schwingenden Dipol hervor, der einem Energieunterschied ΔE zweier Vibrationszustände von

Molekülatomen entspricht, liegt der Resonanzfall vor und das Licht wird adsorbiert. Bei der Berechnung der Intensität A_k der Schwingung k kann, wird von elektrischer und mechanischer Harmonie im Molekül ausgegangen, angenähert durch:

$$A_k = \frac{\pi N_A g_K}{3000 c^2} \left| \frac{\delta \mu}{\delta Q_k} \right|^2$$

Dabei ist N_A die Avogadro Zahl, c die Lichtgeschwindigkeit (in cm pro s), g_K der Faktor der Degeneration, $\frac{\delta \mu}{\delta Q_k}$ das Dipolmoment, abgeleitet nach der k -ten Normalkoordinate Q_k . Alle IR-Linien entsprechen Übergängen von Grundschriftungszustand zu einem angeregtem Schwingungszustand der, in einem gegebenen Schwingungsmodus, ein zusätzliches Quantum hinzugefügt [112, (Hyperchem User Manual, ab Seite CC-365)] .
Seite: 21

single point calculation Berechnung statischer Information wie potentieller Energie und elektrostatischem Potential aus den Koordinaten der Atome und Angaben zu den Bindungen. Auch die Energien der Orbitale und Koeffizienten der Orbitale für den Grundzustand und für angeregte Zustände können berechnet werden. Seite: 20, 21, 185

single pulse NMR-Messverfahren: Durch einen hochfrequenten Impuls werden gleichzeitig alle Kerne eine Sorte (z. B. ^{13}C) angeregt und man misst die Zeit der Relaxation Je nach der chemischen Umgebung der Kerns ist die optimale Resonanzfrequenz verschoben (*engl.: chemical shift*), so kann durch einen Impuls bei einer bestimmten Frequenz eine Kernsorte in einem ganz bestimmten Kontext angeregt werden. Seite: 69

spin multiplicity Die *spin multiplicity* ist $2s + 1$ (s ist hier die Spin Quantenzahl). Moleküle mit kompletter Schale haben eine *spin multiplicity* von 1 (Singlet). Radikale, mit einem ungepaarten Elektron haben eine *spin multiplicity* von 2 (Doublet). Ein Molekül mit zwei ungepaarten Elektronen (meist ein Triplet) hat eine *spin multiplicity* von 3. Seite: 23

STO-3G *engl.: slayter type orbital*. Orbital, das dem Valenzorbital eines isoliertem Atoms entspricht. Ein STO setzt sich bei Hyperchem aus mehreren GTO (gaussian type orbital) zusammen, in diesem Fall aus drei. Es sind vereinfachte Lösungen der Schrödinger-gleichung des Wasserstoffatoms oder eines anderen ein elektronen Systems. Alle STO zusammen werden als **Basisset** bezeichnet [112, (Hyperchem User Manual)]. Seite: 20, 22, 44, 54, 176

Tape Knochenersatzmaterial aus Kollagen und Calciumphosphat in Form eines flaches Gewebes, Herstellung siehe Seite 33. Seite: 30, 33, 169

tapping modeTM Modus bei der Abbildung von Oberflä chen im AFM bei dem die Spitze der Nadel mit ca. 300 kHz schwingt (siehe auch **contact mode**, nicht schwingende Nadel). Der Begriff ist einer Marke von Digital Instruments. Die hier verwendeten Spitzen stammen von *Mikromasch* (Akadeemia tee 21 E, 12618 Tallinn, Estonia).

Spezifikationen des verwendeten Modells NSC15/Al BS/15: *Rectangular cantilever* für TM, Rückseite mit Al beschichtet, Si-geätzte Spitzen mit konischer Form (Konuswinkel 40°). Spezifikationen der hochauflösenden Spitzen DP14/HI RES/Al BS: Rectangular cantilever (160 kHz, 5 N/m), hydrophobe, diamantartige Zusatzspitze am Apex der Si-geätzten Spitze. Es können weitere, kleinere Spitzen in der Nähe der Hauptspitze auftreten Frequenz: 325 kHz, Federhärte 40 N/m Länge/Breite/Dicke des Auslegers (cantilever) 125/35/4 μm Spitzenradius: 1 nm. Seite: 36, 37, 175, 177

TEM Transmissionselektronenmikroskopie, verwendetes Gerät: Zeiss, EM 912 Omega. Seite: 34

TFA Trifluoressigsäure, hier 0,1%ig als Anteil der Matrix bei der MALDI-TOF-MS, chemische Formel: $\text{F}_3\text{C}-\text{COOH}$, Molekulargewicht: 114,03 g/mol, CAS-Nummer: 76-05-1. Seite: 31, 181

TGF- β Familie von Cytokinen die unter anderem Einfluss auf das Knochenwachstum haben (*enlg.*: *transforming growth factor- β*). Dabei binden die TGF- β Liganden aus dem Extrazellulärraum an einen Typ II Rezeptor (T β R-II), der einen Typ I Rezeptor (T β R-I) aktiviert und phosphoryliert. Der Typ I Rezeptor phosphoryliert SMADs (R-SMADS) in der Zelle, die dann wiederum an coSMAD und SMAD4 binden können. Die R-SMAD/coSMAD Komplexe sammeln sich im Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken und an der regulierung des Zielgens teilnehmen [137]. Seite: 14, 176

TGX01 Teststruktur von *Mikromasch* (Akadeemia tee 21 E, 12618 Tallinn, Estonia) zur Überprüfung der AFM Kalibrierung. Produktnummer: TGX01, Periodizität: $3,0 \mu\text{m} \pm 8 \text{ nm}$, Testfläche: 2 x 2 mm, Chipgröße: 5 x 5 x 0,45 mm, Abgebildet auf Seite 36. Seite: 35

Transfektion Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Seite: 3

TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, starke Puffersubstanz. TRIS besitzt eine gute Pufferkapazität zwischen pH 7,2-9,0, pKs: 8,3 (bei 20°C), hemische Formel: $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, CAS-Nummer: 77-86-1, Molare Masse: 121,14 g/mol. Seite: 29, 36, 37

Tropokollagen inaktive Form eines Kollagenmonomers direkt nach der Translation. Im Gegensatz zum assemblierten Monomer befinden sich beim Tropokollagen am C- und N-Terminus ca. 100-Aminosäuren lange Propeptide die durch Amino- und Carboxyprokollagen-Peptidasen entfernt werden. Erst dann können sich Fibrillen bilden [254]. Seite: 11

Ultrazentrifuge Hier verwendetes Gerät: Beckman Coulter, Optima Max mit TLA 55 Rotor. Seite: 27

Uranylacetat $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ zur Kontrastierung in der Elektronenmikroskopie CAS-Nummer: 6159-44-0, Molekulargewicht: 424,15 Da; Fluka Produktnummer: 73943. Seite: 34, 35

UV/Vis Ultraviolett bis sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums 180-780 nm (Wellenzahl 50000 cm^{-1} - 13000 cm^{-1} , Quantenübergang von Bindungselektronen). Verwendetes Gerät bei der Kollagenassemblierung: Cray 50 (Varian), Verwendetes Gerät bei allen anderen Messungen: UV mini 1240 (Shimadzu). Seite: 28, 29

Valinomycin Synonym: Kalium Ionophore I, Neutrale Ionophore $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{18}$, Molekulargewicht: 1111,32 g/mol, CAS-Nummer: 2001-95-8, Sigma-Aldrich Produktnummer: 60403 [194]. Seite: 27, 112, 180

XRD Röntgenbeugung oder Röntgenstreuung (*engl.: x-ray diffraction*). Röntgenstrahlen werden an Kristallgittern gebeugt, so kann ein Kristalltypisches Beugungsbild oder ein Diffraktogramm aufgenommen werden. Diese erlauben Rückschlüsse auf den Aufbau des Kristalls. Hier verwendetes Röntgenpulverdiffraktometer: Siemens D 5000 mit Cobalt- $\text{K}\alpha$ -Strahlung. Seite: III, 2, 41

Zeta-Potential (ζ -Potential) ist das elektrische Potential (auch Coulomb-Potential) an der Abscherschicht eines bewegten Partikels im Bezug auf das Potential in der Lösung. Seite: 10, 97

Abbildungsverzeichnis

2.1	Molekularmodeling: Energie und Gradient in Verlauf der geometrischen Optimierung von $[\text{CaPO}_4\text{H}] \times 2$	22
2.2	Züchten von Brushit	25
2.3	Utensilien zum schnellen Einfrieren von Proben	26
2.4	Eichreihe für Ninhydrinfärbung	29
2.5	Überprüfung der AFM-Spitze und der Kalibrierung des Geräts	36
3.1	Energien und Ladung der Hydrathülle für ausgesuchte Ionen	46
3.2	IR Spektren von simulierten Calciumphosphat Komplexen	51
3.3	Amorphes Calciumphosphat auf Si-Waver im REM	52
3.4	Amorphes Calciumphosphat auf Si-Waver im AFM	53
3.5	Calciumphosphat Kristallite aus wässriger Lösung im REM	53
3.6	Energie gegen Oberflächen von ausgesuchten Calciumphosphatkomplexen . .	55
3.7	Wachstumsmodell für ACP-Kugeln	56
3.8	Elektrostatisches Potential an der v. d. Waals-Oberfläche von Phosphoserin .	58
3.9	Phosphoserin in Calciumphosphatlösung in ESI-MS	61
3.10	Calciumphosphat mit Serin im REM	65
3.11	Calciumphosphat mit Phosphoserin im REM	66
3.12	Calciumphosphat mit Serin im AFM	67
3.13	Calciumphosphat mit Phosphoserin im AFM	68
3.14	NMR von Phosphoserin, Phosphoserin mit Calciumphosphat und Calciumphosphat	71
3.15	Molekülkomplexe der simulierten IR-Spektren von Calciumphosphatkomplexen mit und ohne Phosphoserin	72
3.16	Calciumphosphat mit und ohne Phosphoserin im FT-IR ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) . .	80
3.17	Calciumphosphat mit und ohne Phosphoserin im FT-IR ($400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) . .	81
3.18	Calciumphosphat mit und ohne Phosphoserin im XRD	83
3.19	Calciumphosphat mit und ohne Phosphoserin im REM	84
3.20	Amorphes Calciumphosphat mit und ohne Fetuin, beobachtet im AFM und REM	88
3.21	Auflösen von Brushit in Wasser bzw. Fetuinlösung, beobachtet im AFM . . .	89
3.22	Calciumphosphat-Fetuin Partikel auf Brushit nach 5 min und 2 h, beobachtet im AFM	90
3.23	Brushit, trocken und in TRIS-Puffer, beobachtet im AFM	91
3.24	Brushit mit TRIS und Fetuin im AFM	92
3.25	Calciumphosphat -Hanteln entstanden unter dem Einfluss von Fetuin, im REM	93
3.26	Assemblierung von Kollagen mit Fetuin im UV/vis	94
3.27	In Anwesenheit von Fetuin assembliertes Kollagen, beobachtet im AFM . . .	95
3.28	Tapes (rauhe Seite) mit verschiedenen Mengen Fetuin im REM	96

3.29 Arbeitshypothese zur Entstehung hantelförmiger Strukturen	99
3.30 Osteocalcin in MALDI-MS	101
3.31 Osteocalcin in Aq. dest. im ESI-MS	103
3.32 Osteocalcin in gesättigter Calciumphosphatlösung im ESI-MS	104
3.33 Kollagen mit Calciumphosphat im AFM	109
3.34 Kollagen mit DPPC im AFM	111
3.35 Vesikel im Aq. dest. beobachtet im AFM und REM	113
3.36 Vesikel mit Calciumphosphat im AFM	115
3.37 Vesikel im TEM	117
3.38 Vesikel vor und nach Chloroformspülung im REM	118
3.39 Vesikel mit Calciumphosphat und Calciumphosphat -Phosphoserin-Lösung im REM	118
3.40 Vesikel mit und ohne Ionophoren im REM	119
4.1 Phosphoserin und Serin in der FT-IR, Vergleich des gekauften mit dem selbst phosphoryliertem Phosphoserin	138
4.2 Serin in destiliertem Wasser, ESI-MS	161
4.3 Phosphoserin in destiliertem Wasser, ESI-MS	162
4.4 Serin in Calciumlösung im ESI-MS	163
4.5 Phosphoserin in Calciumlösung im ESI-MS	164
4.6 Serin in Calciumphosphatlösung im ESI-MS	165
4.7 Tapes, glatte Seite mit verschiedenen Mengen Fetuin im REM	169
4.8 Synchrone Mineralisation von Kollagen mit verschiedenen Mengen Fetuin. . .	170
4.9 Phospholipidniederschlag direkt aus Chloroform in AFM, REM und TEM . .	171
4.10 Vesikel mit Calciumphosphat, EDX-Spektrum	172
4.11 Vesikel mit Calciumphosphat und Phosphoserin, EDX-Spektrum	173

Tabellenverzeichnis

1.1	Motivation für die Untersuchung der einzelnen Aspekte der Calciumphosphat(bio)mineralisation	3
1.2	Wichtige physikalische, chemische und biophysikalische Einflüsse auf die Biomineralisation	5
1.3	Einfluss ausgesuchter Ionen auf Calciumphosphat	9
2.1	Vergleich verschiedener Rechenmethoden bei der Molekül Modellierung	22
2.2	Vorgegebene Parameter für die Computermodellierungen	23
2.3	Konzentrationen der Calciumphosphat Stammlösung	24
2.4	Serin und Phosphoserinlösungen für ESI-MS Messungen	31
2.5	Implementierte Arbeitsschritte bei der Präparation von Vesikeln	39
2.6	Präparation der Calciumphosphat-Phosphoserin Proben für NMR und IR Messungen	41
3.1	Bindungsenergien von Calciumphosphatkomplexen	48
3.2	IR-Schwingungen des Phosphat (Computermodell)	48
3.3	Simulierte IR-Spektren mit HPO_4^{2-}	50
3.4	ESI-MS Signale von Phosphoserin in Calciumphosphatlösung	62
3.5	Serin und Phosphoserin in Wasser, mit Ca^{2+} , HPO_4^{2-} und Calciumphosphat im ESI-MS	63
3.6	Banden der ^{13}C NMR Spektren phosphoserinhaltiger Proben	70
3.7	Elementaranalyse der Calciumphosphat-Phosphoserin Proben	82
3.8	Vergleich der Arbeitshypothese mit Literaturergebnissen	100
3.9	Osteocalcin in gesättigter Calciumphosphatlösung im ESI-MS	105
4.1	Gleichgewichtskonstanten zu Calciumphosphat	128
4.2	Dissoziationsenergien von Calciumphosphat	128
4.3	Löslichkeitsprodukte von CaHPO_4 bei verschiedenen Temperaturen	128
4.4	Typische Winkel von Brushitkristalliten	128
4.5	Löslichkeitsprodukt verschiedener Calciumphosphatphasen bei 37°C	128
4.6	Molekularmodellung: Vergleich errechneter Werte mit Literaturdaten	129
4.7	Molekularmodellung: Bindungsenergien, Atomladungen und Atomabstände . .	137
4.8	Terminologie von IR-Schwingungen	139
4.9	Zusammenfassung aller FTIR-Signale von Phosphoserin, Calciumphosphat und verschiedenen Mischungen hiervon sowie Vergleich mit ausgewählten Literaturdaten	140
4.10	Serin in Aq. dest. im ESI-MS	161
4.11	Phosphoserin in Aq. dest. im ESI-MS	162
4.12	Serin in Calciumlösung im ESI-MS	163
4.13	Phosphoserin in Calciumlösung in der ESI-MS	164

4.14 Serin in Calciumphosphat Stammlösung in der ESI-MS	165
4.15 Reihenfolge der ESI-MS Messungen von Serin- und Phosphoserinlösungen . .	166
4.16 Verworfenene ESI-MS Signale aus den Serin- und Phosphoserinproben	166
4.17 Aminosäuren von Osteocalcin	168

Literaturverzeichnis

- [1] F. Abbona and A. Baronnet. A XRD and TEM study on the Transformation of amorphous Calcium Phosphate in the presence of Magnesium. *Journal of Crystal Growth*, 165(1-2):98–105, 1996.
- [2] L. Addadi, J. Moradian-Oldak, H. Füredi-Milhofer, S. Weiner, and A. Veis. Stereochemical Aspects of Crystal Regulation in Calcium Phosphate Associated Mineralized Tissues. *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, pages 153–161, 1992.
- [3] L. Addadi, S. Weiner, and M. Geva. On how Proteins interact with Crystals and their Effect on Crystal Formation. *Zeitschrift für Kardiologie*, 90 Suppl 3:92–8, 2001.
- [4] H. C. Anderson. Molecular Biology of Matrix Vesicles. *Clinical Orthopaedics and related Research*, 314:266–280, 1995.
- [5] H. C. Anderson. Vesicles associated with Calcification in the Matrix of Epiphyseal Cartilage. *Journal of Cell Biology*, 41:59–72, 1996.
- [6] Â. L. Andrade, J. M. F. Ferreira, and R. Z. Domingues. Zeta Potential Measurement in Bioactive Collagen. *Materials Research*, 7(4):631–634, 2004.
- [7] S. Arnold, U. Plate, H. P. Wiesmann, U. Stratmann, H. Kohl, and H. J. Höhling. Quantitative Analyses of the Biomineralization of different hard Tissues. *Journal of Microscopy*, 202(Pt 3):488–494, Jun 2001.
- [8] R. A. Atkinson, J. S. Evans, P. V. Hauschka, B. A. Levine, R. Meats, J. T. Triffitt, A. S. Viridi, and R. J. P Williams. Conformational Studies of Osteocalcin in Solution. *European Journal of Biochemistry*, 232(2):515–521, 1995.
- [9] I. Bakó, J. Hutter, and G. Palinkas. Car-Parrinello Molecular Dynamics Simulation of the Hydrated Calcium Ion. *Journal of Chemical Physics*, 117(21):9838–9843, 2002.
- [10] S. V. Balasubramanian and K. R. K. Easwaran. Aggregation of Calcium Ionophore (A23187) in Phospholipid Vesicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158(3):891–897, February 1989.
- [11] E. L. Bearer and L. Orci. A Simple Method for Quick-Freezing. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 3(2):233 – 241, 1986.
- [12] Peter Behrens and Edmund Bäuerlein, editors. *Handbook of Biomineralization*. Wiley-VCH, 2009.
- [13] V. Benezra Rosen, L.W. Hobbs, and M. Spector. The Ultrastructure of Anorganic bovine Bone and selected synthetic Hydroxyapatites used as Bone Graft Substitute Materials. *Biomaterials*, 23:921–928, 2002.

- [14] F. Betts, N. C. Blumenthal, A. S. Posner, G. L. Becker, and A. L. Lehninger. Atomic Structure of Intracellular Amorphous Calcium Phosphate Deposits. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72(6):2088–2090, 1975.
- [15] A. Bienenstock and A. S. Poener. Calculation of the X-Ray Intensities from Arrays of small Crystallites of Hydroxyapatite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 124:604–615, 1968.
- [16] A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, G. Falini, and K. Rubini. Interaction of acidic Poly-Amino Acids with Octacalcium Phosphate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 95(4):291–296, 2003.
- [17] W. H. Binder, M. Einzmann, M. Knapp, and G. Kohler. Domain Formation in Lipid Bilayer Membranes: Control of Membrane Nanostructure by Molecular Architecture. *Monatshefte für Chemie*, 135:13–21, 2004.
- [18] C. Binkert, M. Demetriou, B. Sukhu, M. Szweras, H. C. Tenenbaum, and J. W. Dennis. Regulation of Osteogenesis by Fetuin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40):28514–28520, October 1 1999.
- [19] D. E. Birk and P. Bruckner. Collagen Suprastructures. *Topics in Current Chemistry*, 247:185–205, 2005.
- [20] N. R. Blandford, G. R. Sauer, B. R. Genge, L. N. Y. Wu, and R. E. Wuthier. Modeling of Matrix Vesicle Biomineralization using Large Unilamellar Vesicles. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94(1-2):14–27, Feb 2003.
- [21] N.C. Blumenthal, F. Betts, and A. S. Posner. Stabilization of Amorphous Calcium Phosphate by Mg and ATP. *Calc. Tiss. Res.*, 23:245–250, 1976.
- [22] N. Bodor, Z. Gabany, and C.-K. Wong. A New Method for the Estimation of Partition Coefficient. *Journal of the American Chemical Society*, 111:3783–3786, 1989.
- [23] N. Bodor, A. Harget, and M.-J. Huang. Neural Network Studies. 1. Estimation of the Aqueous Solubility of Organic Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 113:9480–9483, 1991.
- [24] R. Boistelle and I. Lopez-Valero. Growth Units and Nucleation: The Case of Calcium Phosphates. *Journal of Crystal Growth*, 102:609–617, 1990.
- [25] I. E. Boldeskul, L. F. Sukhodub, A. N. Kalinkevich, and V. D. Khavryutchenko. Ab initio modelling of Calcium Phosphate clusters and their vibrational Spectra. *Condensed Matter Physics*, 9(4):669–679, 2006.
- [26] A. L. Boskey. Biomineralization: Conflicts, Challenges, and Opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 30-31:83–91, 1998.

- [27] A. L. Boskey, S. Gadaleta, C. Gundberg, S. B. Doty, P. Ducy, and G. Karsenty. Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Analysis of Bones of Osteocalcin-deficient Mice provides insight into the Function of Osteocalcin. *Bone*, 23(3):187–196, Sep 1998.
- [28] A. L. Boskey, N. Pleshko, S. B. Doty, and R. Mendelsohn. Applications of Fourier Transform Infrared (ft-ir) Microscopy to the study of Mineralization in Bone and Cartilage. *Cells and Materials*, 2(3):209–220, 1992.
- [29] A. L. Boskey and A. S. Posner. Extraction of a Calcium-Phospholipid-Phosphate Complex from Bone. *Calcified Tissue Research*, 19(4):273–283, Mar 1976.
- [30] A. L. Boskey and A. S. Posner. In vitro Nucleation of Hydroxyapatite by a Bone Calcium-Phospholipid-Phosphate Complex. *Calcified Tissue Research*, 22 Suppl:197–201, May 1977.
- [31] A. L. Boskey, W. Ullrich, L. Spevak, and H. Gilder. Persistence of complexed acidic Phospholipids in rapidly mineralizing Tissues is due to affinity for Mineral and Resistance to hydrolytic Attack: *in vitro* data. *Calcified Tissue International*, 58(1):45–51, Jan 1996.
- [32] C. Bouchet-Marquis, J. Dubochet, and S. Fakan. Cryoelectron Microscopy of vitrified Sections: a new Challenge for the Analysis of functional nuclear Architecture. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1-2):43–51, 2006.
- [33] L. Bozec, J. de Groot., M. Odlyha, B. Nicholls, and M. A. Horton. Mineralised Tissues as Nanomaterials: Analysis by Atomic Force Microscopy. *IEE Proceedings. Nanobiotechnology*, 152(5):183–186, Oct 2005.
- [34] J.-H. Bradt, M. Mertig, A. Teresiak, and W. Pompe. Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation. *Chemistry of Materials*, 11(10):2694 – 2701, 1999.
- [35] L. Brecevic and H. Füredi-Milhofer. Precipitation of Calcium Phosphates Electrolyte Solutions. *Calc. Tiss. Res.*, 10:82–90, 1972.
- [36] E. F. Brès and J. L. Hutchison. Surface Structure Study of Biological Calcium Phosphate Apatite Crystals from Human Tooth Enamel. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63(4):433–40, 2002.
- [37] G. Briganti, C. Cametti, F. Castelli, and A. Raudino. Dielectric Behavior of Lipid Vesicles: The Case of 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles as a Function of Size and Temperature. *Langmuir*, 23(14):7518–7525, Jul 2007.
- [38] W. E. Brown, N. Eidelman, and B. B. Tomazic. Octacalcium Phosphate as a Precursor in Biomineral formation. *Advances in dental research*, 1(2):306–313, December 1987.

- [39] S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O. Podebrad, U. Vietze, T. Weiland, and R. Kniep. Biomimetic Morphogenesis of Fluorapatite-Gelatin Composites: Fractal Growth, the Question of Intrinsic Electric Fields, Core/Shell Assemblies, Hollow Spheres and Reorganization of Denatured Collagen. *European Journal of Inorganic Chemistry*, pages 1643–1653, 1999.
- [40] S. Busch, U. Schwarz, and R. Kniep. Morphogenesis and Structure of Human Teeth in Relation to Biomimetically Grown Fluorapatite-Gelatine Composites. *Chemistry of Materials*, 13(10):3260–3271, 2001.
- [41] J. Byrd, F. Vila, Y. Takimoto, and J. Rehr. Molecular Dynamics Simulation of Ca^{2+} Hydration and the Optical Response of clustered Water. In *Physics REU*, 2005.
- [42] F. L. Camolezi, K. R. Daghashtanli, P. P. Magalhães, J. M. Pizauro, and P. Ciancaglini. Construction of an Alkaline Phosphatase-Liposome System: a Tool for Biomineralization study. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(9):1091–1101, September 2002.
- [43] F. L. Camolezi, J. M. Pizauro, F. A. Leone, and P. Ciancaglini. A simple Laboratory Experiment to Demonstrate the Interaction of Proteins bearing Glycosyl Phosphatidylinositol Anchors with Liposomes. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 27:37–40, 1999.
- [44] S. A. Carr, P. V. Hauschka, and K. Biemann. Gas Chromatographic Mass Spectrometric Sequence determination of Osteocalcin, a γ -carboxyglutamic acid-containing Protein from Chicken Bone. *Journal of Biological Chemistry*, 256(19):9944–9950, Oct 1981.
- [45] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, and M. J. Glimcher. Poorly crystalline apatites: Evolution and Maturation in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22(4):310–317, 2004.
- [46] M. C. Chang, C.-C. Ko, and W. H. Douglas. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials*, 24:2853–2862, 2003.
- [47] H. Chen, P. R. Srinivas, L. N. Cong, Y. Li, G. Grunberger, and M. J. Quon. α_2 -Heremans Schmid Glycoprotein inhibits insulin-stimulated Elk-1 Phosphorylation, but not Glucose Transport, in Rat adipose Cells. *Endocrinology*, 139(10):4147–54, Oct 1998.
- [48] H. Cölfen and L. Qi. A Systematic Examination of the Morphogenesis of Calcium Carbonate in the Presence of a Double-Hydrophilic Block Copolymer. *Chemistry - a European Journal*, 7(1):106–116, 2001.
- [49] D. E. Corbridge, editor. *Studies in Inorganic Chemistry 10; Phosphorous; An Outline of Chemistry, Biochemistry and Technology*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 10 edition, 1990.

- [50] N. J. Crane, V. Popescu, M. D. Morris, P. Steenhuis, and M. A. Ignelzi. Raman spectroscopic Evidence for Octacalcium Phosphate and other transient Mineral Species deposited during intramembranous Mineralization. *Bone*, 39(3):434–442, Sep 2006.
- [51] M. Demetriou, C. Binkert, B. Sukhu, H. C. Tenenbaum, and J. W. Dennis. Fetuin/ α_2 -HS Glycoprotein is a Transforming Growth Factor-beta type II receptor mimic and Cytokine Antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, 271(22):12755–61, May 1996.
- [52] R. Despotović, N. Filipović-Vinceković, and H. Füredi-Milhofer. Precipitation of Calcium Phosphates from electrolyte Solutions. iii. Radiometric studies of the kinetics of Precipitation and aging of Calcium Phosphates. *Calcified Tissue Research*, 18(1):13–26, Jul 1975.
- [53] R. Dittich, F. Despang, A. Bernhardt, A. Mannschatz, Th. Hanke, G. Tomandl, W. Pompe, and M. Gelinsky. Mineralized Scaffolds for Hard Tissue Engineering by Ionotropic Gelation of Alginate. *Advances in Science and Technology*, 49:159–164, 2006.
- [54] R. A. Dluhy, D. G. Cameron, and H. H. Manisch. Infrared Spectroscopic Evidence for Intermolecular hydrogen bonding in O-phospho-L-Serine: A model for an anionic lipid Headgroup. *Biochimica et Biophysica Acta*, 80:160164, 1984.
- [55] S. Dorozhkin, E. Dorozhkina, and M. Epple. A Model System to Provide a Good in Vitro Simulation of Biological Mineralization. *Crystal Growth and Design*, 4(2):389–395, 2004.
- [56] S. V. Dorozhkin. A Review on the Dissolution Models of Calcium Apatite. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 44:45–61, 2002.
- [57] S. V. Dorozhkin and M. Epple. Die biologische und medizinische Bedeutung vom Calciumphosphaten. *Angewandte Chemie*, 114:3260–3277, 2002.
- [58] T. L. Dowd, J. F. Rosen, L. Li, and C. M. Gundberg. The Three Dimensional Structure of Bovine Calcium Ion Bound Osteocalcin Using ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 42:7769–7779, 2003.
- [59] K. Dreisewerd, A. Rohlfing, B. Spottke, C. Urbanke, and W. Henkel. Characterization of whole Fibril-forming Collagen Proteins of Types I, III, and V from fetal calf skin by Infrared Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(13):3482–3491, Jul 2004.
- [60] E. D. Eanes. Biophysical Aspects of Lipid Interaction with Mineral: Liposome model studies. *Anatomical Record*, 224(2):220–225, Jun 1989.
- [61] E. D. Eanes. Mixed Phospholipid Liposome Calcification. *Bone and Mineral*, 17(2):269–272, May 1992.

- [62] E. D. Eanes and A. W. Hailer. Anionic Effects on the Size and Shape of Apatite Crystals grown from Physiological Solutions. *Calcified Tissue International*, 66(6):449–455, Jun 2000.
- [63] E. D. Eanes, A. W. Hailer, and J. L. Costa. Calcium Phosphate Formation in Aqueous Suspensions of Multilamellar Liposomes. *Calcified Tissue International*, 36(4):421–430, Jul 1984.
- [64] E. D. Eanes, A. W. Hailer, R. J. Midura, and V. C. Hascall. Proteoglycan Inhibition of Calcium Phosphate Precipitation in Liposomal Suspensions. *Glycobiology*, 2(6):571–578, Dec 1992.
- [65] E. D. Eanes and J. L. Meyer. The Maturation of Crystalline Calcium Phosphates in Aqueous Suspensions at Physiologic pH. *Calcified Tissue Research*, 23(3):259–269, Oct 1977.
- [66] E. D. Eanes, J. D. Termine, and M. U. Nylen. An Electron Microscopic study of the Formation of Amorphous Calcium Phosphate and its Transformation to Crystalline Apatite. *Calcified Tissue Research*, 12(2):143–158, May 1973.
- [67] C. Ebner, U. Onthong, and M. M. Probst. Computational study of Hydrated Phosphate Anions. *Journal of Molecular Liquids*, 118(1-3):15–25, April 2005.
- [68] H. Ehrlich, T. Douglas, D. Scharnweber, T. Hanke, R. Born, S. Bierbaum, and H. Worch. Hydroxyapatite Crystal Growth on Modified Collagen I-Templates in a Model Dual Membrane Diffusion System. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 631:1825–1830, 2005.
- [69] H. Ehrlich, T. Hanke, A. Frolov, T. Langrock, R. Hoffmann, C. Fischer, U. Schwarzenbolz, T. Henle, R. Born, and H. Worch. Modification of Collagen *in vitro* with respect to Formation of N^ε-Carboxymethyllysine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44:51–56, 2009.
- [70] S. J. Eppell, W. Tong, J. L. Katz, L. Kuhn, and M. J. Glimcher. Shape and size of isolated Bone Mineralites measured using Atomic Force Microscopy. *Journal of Orthopaedic Research*, 19(6):1027–1034, Nov 2001.
- [71] K. Flade, C. Lau, M. Mertig, and W. Pompe. Osteocalcin controlled dissolution-reprecipitation of calcium phosphate under biomimetic conditions. *Chemistry of Materials*, 13:3596–3602, 2001.
- [72] F. M. Floris, M. Persico, A. Tani, and J. Tomasi. Hydration shell structure of the calcium ion from simulations with ab initio effective pair potentials. *Chemical Physics Letters*, 227:126–132, 1994.

- [73] B. O. Fowler, E. C. Moreno, and W. E. Brown. Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. *Arch. of oral Biol.*, 11:477–492, 1966.
- [74] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, and P. Roschger. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry*, 14:2115–2123, 2004.
- [75] P. Fratzl, K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch, and S. Bernstorff. Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *Journal of Structural Biology*, 122:119–122, 1997.
- [76] R. Fujisawa and Y. Kuboki. Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta*, 1075(1):56–60, Sep 1991.
- [77] Y. Gaber, K. Tiedemann, D. P. Reinhard, and J. Brinckmann. Veränderungen der Quervernetzungen im kollagenen Bindegewebe bei Dermatoliposklerose. *Phlebologie*, 33:8–11, 2004.
- [78] S. J. Gadaleta, E. P. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: New correlations between x-ray diffraction and infrared data. *Calcified Tissue International*, 58(1):9–16, January 1996.
- [79] R. Garimella, X. Bi, H. C. Anderson, and N. P. Camacho. Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: an FTIR imaging study. *Bone*, 38(6):811–817, Jun 2006.
- [80] A. Gavezotti. The calculation of molecular volumes and the use of volume analysis in the investigation of structured media and of solid-state organic reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, 105:5220–5225, 1983.
- [81] M. Gelinsky, U. König, A. Sewing, and W. Pompe. Porous scaffolds made from mineralised collagen - a biomimetic bone graft material. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 35(4):229–233, 2004.
- [82] M. Gelinsky, S. Lenhard, R. Born, H. Domaschke, and W. Pompe. Influence of osteocalcin on *in vitro* mineralization of collagen type I. In *International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, 2004.
- [83] A. George, L. Bannon, B. Sabsay, J. W. Dillon, J. Malone, A. Veis, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, and N.G. Copeland. The carboxylterminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxylphosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *Journal of Biological Chemistry*, 271:32869–32873, 1996.

- [84] F. N. Ghadially. As you like it, part 3: A critique and historical review of calcification as seen with the electron microscope. *Ultrastruct Pathol*, 25(3):243–267, 2001.
- [85] M. J. Glimcher, L. C. Bonar, M. D. Gryn timer, W. J. Landis, and A. H. Roufosse. Recent studies of bone mineral: Is the amorphous calcium phosphate theory valid? *Journal of Crystal Growth*, 53:100–119, 1981.
- [86] M. J. Glimcher, D. Kossiva, and D. Brickley-Parsons. Phosphoproteins of chicken bone matrix. proof of synthesis in bone tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 259(1):290–293, Jan 1984.
- [87] S. Gomez, J. M. Lopez-Cepero, G. Silvestrini, and E. Bonucci. Matrix vesicles and focal proteoglycan aggregates are the nucleation sites revealed by the lanthanum incubation method: a correlated study on the hypertrophic zone of the rat epiphyseal cartilage. *Calcified Tissue International*, 58(4):273–282, Apr 1996.
- [88] M.S. Gordon. The isomers of silacyclopropane. *Chem. Phys. Lett.*, 76:163, 1980.
- [89] L. B. Gower and D. J. Odom. Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. *Journal of Crystal Growth*, 210(4):719–734, 2000.
- [90] D. J. Graves and S. Luo. Use of photoacoustic fourier-transform infrared spectroscopy to study phosphates in proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(1):618–624, 1994.
- [91] Veeco Metrology Group, editor. *MultiMode SPM Instruction Manual, Version 4.31ce, Digital Instruments*. Digital Instruments, 1997.
- [92] P. C. Hariharan and J. A. Pople. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theoretica Chimica Acta*, 28:213–222, 1973.
- [93] J.E. Harries, D.W.L. Hukins, C. Holt, and S.S. Hasnain. Conversion of amorphous calcium phosphate into hydroxyapatite investigated by EXAFS spectroscopy. *Journal of Crystal Growth*, 84:563570, 1987.
- [94] K. Hashimoto. Ultrastructure of freeze-cleaved dermal collagen. *Acta Dermato-Venereologica*, 54(4):241–248, 1974.
- [95] W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople. Self-consistent molecular orbital methods. XII. further extensions of gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. *Journal of Chemical Physics*, 56:2257–2261, 1972.
- [96] A. Heiss, A. DuChesne, B. Denecke, J. Grötzinger, K. Yamamoto, T. Renne, and W. Jahnen-Dechent. Structural basis of calcification inhibition by α_2 -HS glycoprotein/fetuin-a. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15):13333–13341, April 11 2003.

- [97] A. Heiss, T. Eckert, A. Aretz, W. Richtering, W. van Dorp, C. Schäfer, and W. Jahnen-Dechent. Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *Journal of Biological Chemistry*, A XRD and TEM study on the transformation of amorphous calcium phosphate in the presence of magnesium, Mar 2008.
- [98] A. Heiss, W. Jahnen-Dechent, H. Endo, and D. Schwahn. Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids. *Biointerphases, American Vacuum Society*, 2(1):16–20, March 2007.
- [99] Wolf-Alexander Heiss. *Zur molekularen Topologie der Bindung natürlicher und rekombinanter Varianten von α_2 -HS-Glycoprotein/Fetuin an Hydroxylapatit*. PhD thesis, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 2002.
- [100] B. R. Heywood and E. D. Eanes. An ultrastructural study of the effects of acidic phospholipid substitutions on calcium phosphate precipitation in anionic liposomes. *Calcified Tissue International*, 50(2):149–156, Feb 1992.
- [101] P. E. Hillner, S. Manne, P. K. Hansma, and A. J. Gratz. Atomic-scale imaging of calcite growth and dissolution in real time. *Geology*, 20(4):359–362, 1992.
- [102] Thomas Whiteside Hime. Cilinical experiences. *The Lancet*, 103(2630):127–128, 1874.
- [103] Q. Q. Hoang, F. Sicheri, A. J. Howard, and D. Yang. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, 425(6961):977–80, Oct 2003.
- [104] A. J. Hodge and J. A. Petruska. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecule. in: Ramachandran. *Aspects of Protein Structure*. Academic Press, New York, pages 289–300, 1963.
- [105] C. Holt, M. J. J. M. Van Kemenade, J. E. Harries, L. S. Nelson, R. T. Bailey, D. W. L. Hukins, S. S. Hasnain, and P. L. DeBruyn. Preparation of amorphous calcium-magnesium phosphates at ph 7 and characterization by x-ray absorption and fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Crystal Growth*, 92:239–252, 1988.
- [106] R. Hosemann and G. Schoknecht. Entfaltung parakristalliner Gitter. *Colloid & Polymer Science*, 152(1):45–49, 1956.
- [107] Bing hua Chai, Jian ming Zheng, Qing Zhao, and Gerald H Pollack. Spectroscopic studies of solutes in aqueous solution. *J Phys Chem A*, 112(11):2242–2247, Mar 2008.
- [108] E. O. Huffman, W. E. Cate, M. E. Deming, and K. L. Elmore. Solubility of phosphates, rates of solution of calcium phosphates in phosphoric acid solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(4):266–275, 1957.
- [109] G. K. Hunter and H. A. Goldberg. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90:8562–8565., 1993.

- [110] G. K. Hunter, P. V. Hauschka, A. R. Poole, L. C. Rosenberg, and H. A. Goldberg. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*, 317 (Pt 1):59–64, Jul 1996.
- [111] G. K. Hunter, C. L. Kyle, and H. A. Goldberg. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochemical Journal*, 300 (Pt 3):723–728, Jun 1994.
- [112] Inc. Hypercube. Hyperchem(tm) professional 7.51. <http://www.hyper.com/>, Gainesville:Florida 32601, USA, 1115 NW 4th Street.
- [113] Mayumi Iijima. Formation of ocp in vitro. *Monogr. Oral. Sci.*, 18:17–49, 2001.
- [114] Mayumi Iijima, Yutaka Moriwaki, and Yoshinori Kuboki. In vitro crystal growth of octacalcium phosphate on type i collagen fiber. *Journal of Crystal Growth*, 137:553–560, 1994.
- [115] T. Ikeda, M. Boero, and K. Terakura. Hydration properties of magnesium and calcium ions from constrained first principles molecular dynamics. *Journal of Chemical Physics*, 127:074503–1 – 074503–8, 2007.
- [116] D. T. Isbell, S. Du, A. G. Schroering, G. Colombo, and J. G. Shelling. Metal ion binding to dog osteocalcin studied by ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 32(42):11352–11362, Oct 1993.
- [117] N. Ise, H. Matsuoka, and K. Ito. Ordering and organization in ionic solutions and emulsions. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 166/167:111–130, 1989.
- [118] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, and M. Epple. A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44(6):573–580, May 2006.
- [119] W. Jahnen-Dechent, C. Schäfer, A. Heiss, and J. Grötzinger. Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein α_2 -HS glycoprotein/fetuin. *Zeitschrift fur Kardiologie*, 90 Suppl 3:47–56, 2001.
- [120] Willi Jahnen-Dechent. lots wifes problem gelst? regulation der biologischen calcifizierung. *BIOspektrum*, 3:254–257, 2004.
- [121] F. Jalilehvand, D. Spangberg, P. Lindqvist-Reis, K. Hermansson, I. Persson, and M. Sandstrom. Hydration of the calcium ion. an EXAFS, large-angle x-ray scattering, and molecular dynamics simulation study. *Journal of the American Chemical Society*, 123:431–441, 2001.
- [122] K. Jaovisidha, J. Hung, G. Ning, L. M. Ryan, and B. A. Derfus. Comparative calcification of native articular cartilage matrix vesicles and nitroprusside-generated vesicles. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(8):646–652, Aug 2002.

- [123] George A. Jeffrey. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, 1997.
- [124] F. Jiang, K. Khairy, K. Poole, J. Howard, and D. J. Müller. Creating nanoscopic collagen matrices using atomic force microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 64(5-6):435–440, Aug 2004.
- [125] John Wesley Judd. On the unmaking of flints. *Proceedings of the Geological Association*, x(5):217–226, 1887.
- [126] N. Kanzaki, G. Treboux, K. Onuma, S. Tsutsumi, and A. Ito. Calcium phosphate clusters. *Biomaterials*, 22(21):2921–2929, November 2001.
- [127] J. A. Kazi, O. Nakamura, T. Ohnishi, N. Arakaki, T. Kajihara, S. Nakagawa, and Y. Daikuhara. Changes with age of the rat fetuin concentration in serum and its mRNA expression. *Journal of Biochemistry*, 124(1):179–186, Jul 1998.
- [128] N. L. Kelleher, R. A. Zubarev, K. Bush, B. Furie, B. C. Furie, F. W. McLafferty, and C. T. Walsh. Localization of labile posttranslational modifications by electron capture dissociation: the case of gamma-carboxyglutamic acid. *Analytical Chemistry*, 71(19):4250–3, Oct 1999.
- [129] W. Kibalczyk and K. Bondarczuk. Light scattering study of calcium phosphate precipitation. *Journal of Crystal Growth*, 71:751–756, 1985.
- [130] Masanori Kikuchi, Toshiyuki Ikoma, Soichiro Itoh, Hiroko N. Matsumoto, Yoshihisa Koyama, Kazuo Takakuda, Kenichi Shinomiya, and Junzo Tanaka. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Composites Science and Technology*, 64(6):819–825, May 2004.
- [131] H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, and T. Nakamura. Composition and structure of apatite formed on organic polymer in simulated body fluid with a high content of carbonate ion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11(7):421–426, Jul 2000.
- [132] A. Klimov and G. H. Pollack. Visualization of charge-carrier propagation in water. *Langmuir*, 23(23):11890–11895, Nov 2007.
- [133] B. Knepper-Nicolai, A. Reinstorf, I. Hofinger, K. Flade, R. Wenz, and W. Pompe. Influence of osteocalcin and collagen i on the mechanical and biological, properties of biocement d. *Biomolecular Engineering*, 19:227–231, 2002.
- [134] L. Knott and A. J. Bailey. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*, 22(3):181–187, 1998.

- [135] D. M. Kohler, M. A. Crenshaw, and A. L. Arsenault. Three-dimensional analysis of mineralizing turkey leg tendon: Matrix vesicle-collagen relationships. *Matrix Biology*, 14:543–552, 1994.
- [136] Koutsopoulos. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62:600–612, 2002.
- [137] Gerhard Krauss, editor. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. Number ISBN 978-3-527-31397-6. Wiley-VCH, Weinheim, 4. auflage edition, 2008.
- [138] B. Lambie, R. Ramaekers, and G. Maes. Conformational behavior of serine: An experimental matrix-isolation ft-ir and theoretical dft(b3lyp)/6-31++g** study. *Journal of Physical Chemistry*, 108:10426–10433, 2004.
- [139] W. J. Landis. Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connective Tissue Research*, 34(4):239–246, 1996.
- [140] W. J. Landis, K. J. Hodgins, M. J. Song, J. Arena, S. Kiyonaga, M. Marko, C. Owen, and B. F. McEwen. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *Journal of Structural Biology*, 117(1):24–35, 1996.
- [141] W. J. Landis and F. H. Silver. The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 133:1135–1157, 2002.
- [142] W. J. Landis and M. J. Song. Early mineral deposition in calcifying tendon characterized by high voltage electron microscopy and three-dimensional graphic imaging. *Journal of Structural Biology*, 107(2):116–127, Oct 1991.
- [143] W. J. Landis, M. J. Song, A. Leith, L. McEwen, and B. F. McEwen. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopy and tomography and graphic image reconstruction. *Journal of Structural Biology*, 110:39–54, 1993.
- [144] K. Leberle, I. Kempf, and G. Zundel. An intramolecular hydrogen bond with large proton polarizability within the head group of phosphatidylserine an infrared investigation. *Biophysical Journal*, 55:637–648, 1989.
- [145] A. J. Lee, S. Hodges, and R. Eastell. Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 37 (Pt 4):432–446, Jul 2000.
- [146] D. D. Lee and M. J. Glimcher. Three-dimensional spatial relationship between the collagen fibrils and the inorganic calcium phosphate crystals of pickerel (*americanus americanus*) and herring (*clupea harengus*) bone. *Journal of Molecular Biology*, 217(3):487–501, Feb 1991.

- [147] R. Z. LeGeros, G. Daculsi, I. Orly, T. Abergas, and W. Torres. Solution mediated transformation of octacalcium phosphate (ocp) to apatite. *Scanning Microscopy*, 3(1):129–138, 1989.
- [148] R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros. Brushite crystals grown by diffusion in silica gel and in solution. *Journal of Crystal Growth*, 13-14:476–480, 1972.
- [149] H. Liebig and G. Dransch. Verfahren zur herstellung von o-serinphosphat. *Patentschrift 1151810*, 1963.
- [150] E. M. Little and C. Holt. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. *European Biophysics Journal*, 33(5):435–447, Aug 2004.
- [151] K. A. Lomashvili, S. Cobbs, R. A. Hennigar, K. I. Hardcastle, and W. C. O'Neill. Phosphate-induced Vascular Calcification: Role of Pyrophosphate and Osteopontin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(6):1392–401, Jun 2004.
- [152] J. R. Long, W. J. Shaw, P. S. Stayton, and G. P. Drobny. Structure and dynamics of hydrated statherin on hydroxyapatite as determined by solid-state NMR. *Biochemistry*, 40(51):15451–15455, Dec 2001.
- [153] J. P. Lowe. *Quantum Chemistry*. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.
- [154] A. D. MacKerell, D. Bashford, Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, and M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18):3586–3616, 1998.
- [155] S. Maheshwary, N. Patel, N. Sathyamurthy, A. D. Kulkarni, and S. R. Gadre. Structure and stability of water clusters (H₂O)_n, n = 8-20: An *ab initio* investigation. *Journal of Physical Chemistry A*, 105:10525–10537, 2001.
- [156] R. Mai, R. Lux, P. Proff, G. Lauer, W. Pradel, H. Leonhardt, A. Reinstorf, M. Gelinsky, R. Jung, U. Eckelt, T. Gedrange, and B. Stadlinger. O-phospho-l-serine: a modulator of bone healing in calcium-phosphate cements. *Biomedizinische Technik / Biomedical Engineering*, 53:229–233, 2008.
- [157] M. Martina, G. Kil, and E. Cherubini. The effect of Intracellular Ca²⁺ on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. *Journal of Membrane Biology*, 142:209–216, 1994.

- [158] A. McPherson and P. Shlichta. Heterogeneous and epitaxial nucleation of protein crystals on mineral surfaces. *Science*, 239(4838):385–387, 1988.
- [159] J. Menanteau, W. F. Neuman, and M. W. Neuman. A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 4(2):157–162, 1982.
- [160] R. Mendelsohn, A. Hassankhani, E. DiCarlo, and A. Boskey. FT-IR microscopy of endochondral ossification at 20 μ m spatial resolution. *Calcified Tissue International*, 44(1):20–24, Jan 1989.
- [161] J. L. Meyer and E. D. Eanes. A thermodynamic analysis of the amorphous to crystalline calcium phosphate transformation. *Calcified Tissue Research*, 25(1):59–68, Feb 1978.
- [162] J. L. Meyer and E. D. Eanes. A thermodynamic analysis of the secondary transition in the spontaneous precipitation of calcium phosphate. *Calcified Tissue Research*, 25(3):209–216, Aug 1978.
- [163] D. N. Misra. Interaction of ortho-phospho-l-serine with hydroxyapatite: Formation of a surface complex. *Journal of Colloid and Interface Science*, 194(1):249–255, Oct 1997.
- [164] P. C. H. Mitchell, S. F. Parker, K. Simkiss, Jane Simmons, and Marina G. Taylor. Hydrated sites in biogenic amorphous calcium phosphates: An infrared, raman, and inelastic neutron scattering study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 62(3):183–197, 1996.
- [165] J. Momm. *Herstellung und Charakterisierung von unsymmetrischen Liposomen unter Verwendung von rekombinanten Proteinen*. Inauguraldissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Februar 2004.
- [166] S. Moore. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 243(23):6281–6283, Dec 1968.
- [167] J. Moradian-Oldak. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology*, 20(5-6):293–305, Sep 2001.
- [168] E. C. Moreno, M. Kresak, and D. I. Hay. Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcified Tissue International*, 36(1):48–59, 1984.
- [169] W. L. Murphy and P. B. Messersmith. Compartmental control of mineral formation: adaptation of a biomineralization strategy for biomedical use. *Polyhedron*, 19(3):357–363, 2000.
- [170] M. Murshed, T. Schinke, M. D. McKee, and G. Karsenty. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *Journal of Cell Biology*, 165(5):625–630, Jun 7 2004.

- [171] G. H. Nancollas. Phase transformation during precipitation of calcium salts. In *Biological Mineralization and Demineralization*, pages 79–99. Dahlem Conference, Springer-Verlag, 1982.
- [172] H. Niiranen, B. A. Budnik, R. A. Zubarev, S. Auriola, and S. Lapinjoki. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry and electron-capture dissociation tandem mass spectrometry of osteocalcin: Determination of γ -carboxyglutamic acid residues. *Journal of Chromatography A*, 962(1-2):95–103, July 2002.
- [173] M. Nousiainen, P. J. Derrick, M. T. Kaartinen, P. H. Maenpaa, J. Rouvinen, and P. Vainiotalo. A mass spectrometric study of metal binding to osteocalcin. *Chemistry & Biology*, 9(2):195–202, 2002.
- [174] M. U. Nysten, E. D. Eanes, and J. D. Termine. Molecular and ultrastructural studies of non-crystalline calcium phosphates. *Calcified Tissue Research*, 9(2):95–108, 1972.
- [175] A. Ohshima, T. Konishi, J. Yamanaka, and N. Ise. Ordered structure in ionic dilute solutions: Dendrimers with univalent and bivalent counterions. *Physical Review E*, 64:051808–1–051808–9, 2001.
- [176] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, and L. B. Gower. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering*, 58:77–116, 2007.
- [177] Peggy H. Ostrom, Michael Schall, Hasand Gandhi, Tun-Li Shen, Peter V. Hauschka, John R. Strahler, and D. A. Gage. New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(6):1043–1050, March 2000.
- [178] P. M. Palagi, D. Walther, M. Quadroni, S. Catherinet, J. Burgess, C. G. Zimmermann-Ivol, J.-C. Sanchez, P.-A. Binz, D. F. Hochstrasser, and R. D. Appel. Msight: An image analysis software for liquid chromatography-mass spectrometry. *Proteomics*, 5:2381 – 2384, 2005.
- [179] O. Paris, I. Zizak, H. Lichtenegger, P. Roschger, K. Klaushofer, and P. Fratzl. Analysis of the hierarchical structure of biological tissues by scanning X-ray scattering using a micro-beam. *Cellular and Molecular Biology*, 46(5):993–1004, Jul 2000.
- [180] E. P. Paschalis, F. Betts, E. DiCarlo, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey. Ftir micro-spectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcif Tissue Int*, 61(6):480–486, Dec 1997.
- [181] L. Perera, U. Essmann, and M.L. Berkowitz. The role of water in the hydration force - molecular dynamics simulations. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 103:107–115, 1997.

- [182] F. Peters and M. Epple. Simulating arterial wall calcification in vitro: biomimetic crystallization of calcium phosphates under controlled conditions. *Zeitschrift für Kardiologie*, 90 suppl 3:III/81 – III/85, 2001.
- [183] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1605–1612, Oct 2004.
- [184] A. Peytcheva and M. Antonietti. Ortsspezifische Auflösung von Calciumphosphat mit Polymeren: “Schnitzen auf der Nanoskala”. *Angewandte Chemie*, 113(18):3484–3488, 2001.
- [185] Anna Peytcheva. *Kolloidales Calciumphosphat mit polymeren Additiven: Struktur und Dynamik*. PhD thesis, Universität Potsdam, 2000.
- [186] N. G. Phillips, C. W. S. Conover, and L. A. Bloomfield. Calculations of the binding energies and structures of sodium chloride clusters and cluster ions. *Journal of Chemical Physics*, 7:4980–4987, 1991.
- [187] J.-P. Piquemal, L. Perera, and G. A. Cisneros. Towards accurate solvation dynamics of divalent cations in water using the polarizable amoeba force field: From energetics to structure. *Journal of Chemical Physics*, 125:054511–1 – 054511–7, 2006.
- [188] U. Plate, S. Arnold, U. Stratmann, H. P. Wiesmann, and H. J. Höhling. General principle of ordered apatitic crystal formation in enamel and collagen rich hard tissues. *Connective Tissue Research*, 38(1-4):149–157; discussion: 201–205, 1998.
- [189] U. Plate, T. Tkotz, H. P. Wiesmann, U. Stratmann, U. Joos, and H. J. Höhling. Early mineralization of matrix vesicles in the epiphyseal growth plate. *Journal of Microscopy*, 183(Pt 1):102–107, Jul 1996.
- [190] L. Pogliani, D. Ziessow, and Ch. Krüger. Conformational study of phosphoserine in aqueous solution. i - $a^{13}\text{C}$ NMR results. *Organic Magnetic Resonance*, 9(9):504–507, 1977.
- [191] L. Pogliani, D. Ziessow, and Ch. Krüger. Conformational study of phosphoserine in aqueous solutions. ii - ^1H NMR results. *Organic Magnetic Resonance*, 10(1):26–30, 1977.
- [192] G. H. Pollack and J. Clegg. Unexpected linkage between unstirred layers, exclusion zones, and water. *Phase Transitions in Cell Biology*, pages 143–152, 2008.
- [193] A. S. Posner, F. Betts, and N. C. Blumenthal. Properties of nucleating systems. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 1(2):179–183, 1978.
- [194] B. C. Pressman. Biological applications of ionophores. *Annual Reviews*, 45:501–530, 1976.

- [195] P. A. Price and J. E. Lim. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24):22144–52, Jun 2003.
- [196] P. A. Price, M. K. Williamson, T. M. T. Nguyen, and T. N. Than. Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3):1594–1600, Jan 2004.
- [197] Paul A. Price, Thao Minh Thi Nguyen, and Matthew K. Williamson. Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex. *J. Biol. Chem.*, 278(24):22153–22160, 2003.
- [198] R. V. Prigodich, T. O’Connor, and J. E. Coleman. ^1H , ^{113}Cd , and ^{31}P NMR of osteocalcin (bovine gamma-carboxyglutamic acid containing protein). *Biochemistry*, 24(22):6291–6298, Oct 1985.
- [199] R. V. Prigodich and M. R. Vesely. Characterization of the complex between bovine osteocalcin and type i collagen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 345(2):339–341, 1997.
- [200] O. Prymak, V. Sokolova, T. Peitsch, and M. Epple. The crystallization of fluoroapatite dumbbells from supersaturated aqueous solution. *Crystal Growth and Design*, 6(2):498–506, 2006.
- [201] E. F. Putkey and M. Sundaralingam. Molecular structures of amino acids and peptides. i. the crystal structure and conformation of dl-o-serine phosphate monohydrate. very short phosphate-phosphate hydrogen bonds. *Acta Crystallographica*, B26:782–789, 1970.
- [202] S. Rammelt, M. Neumann, U. Hanisch, A. Reinstorf, W. Pompe, H. Zwipp, and A. Biewener. Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 73(3):284–294, Jun 2005.
- [203] M. Raspanti, A. Alessandrini, P. Gobbi, and A. Ruggeri. Collagen fibril surface: TMAFM, FEG-SEM and freeze- etching observations. *Microscopy Research and Technique*, 35:87–93, 1996.
- [204] M. Raspanti, A. Alessandrini, V. Ottani, and A. Ruggeri. Direct visualization of collagen-bound proteoglycans by tapping-mode atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 119(2):118–122, Jul 1997.
- [205] D. Reigada, I. D  z-Pérez, P. Gorostiza, A. Verdaguer, I. G. de Aranda, O. Pineda, J. Vilarrasa, J. Marsal, J. Blasi, J. Aleu, and C. Solsona. Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6):3485–3490, 2003.

- [206] A. Reinstorf, M. Ruhnnow, M. Gelinsky, W. Pompe, U. Hempel, K.-W. Wenzel, and P. Simon. Phosphoserine - a convenient compound for the modification of calciumphosphate bonecement collagen composite. *Journal of Materials science: Materials in Medicine*, 15:451 – 455, 2004.
- [207] Antje Reinstorf. *Biomimetisch gelenkte Synthese von Calciumphosphatzementen*. PhD thesis, Technische Universität Dresden, 2005.
- [208] J. L. Reynolds, A. J. Joannides, J. N. Skepper, R. McNair, L. J. Schurgers, D. Proudfoot, W. Jahnen-Dechent, P. L. Weissberg, and C. M. Shanahan. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(11):2857–2867, Nov 2004.
- [209] C. V. M. Rodrigues, P. Serricella, A. B. R. Linhares, R. M. Guerdes, R. Borojevic, M. A. Rossi, E. L. Duarte, and M. Farina. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24(27):4987–97, Dec 2003.
- [210] L. M. Rodriguez-Lorenzo. Studies on calcium deficient apatites structure by means of MAS-NMR spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16:393–398, 2005.
- [211] E. A. Ruben, M. S. Chapman, and J. D. Evanseck. Hydrogen bonding mediated by key orbital interactions determines hydration enthalpy differences of phosphate water clusters. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(42):10804–10814, 2007.
- [212] F. Rusconi. GNU polyxmass: a software framework for mass spectrometric simulations of linear (bio-)polymeric analytes. *Bioinformatics*, 7:226, 2006.
- [213] F Rusconi. Massxpert 2: A Cross-platform Software Environment for Polymer Chemistry Modelling and Simulation/Analysis of Mass Spectrometric Data. *Bioinformatics*, 25:2741–2742, 2009.
- [214] J. M. Sanchez-Ruiz and M. Martinez-Carrion. A fourier-transform infrared spectroscopic study of the phosphoserine residues in hen egg phosphovitin and ovalbumin. *Biochemistry*, 27:33383342, 1988.
- [215] M. B. Sankaram, B. P. Shastri, and K. R. Easwaran. Interaction of carrier ionophores with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 26(16):4936–4941, Aug 1987.
- [216] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, and R. B. Merrifield. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*, 117:147–157, 1981.

- [217] C. Schäfer, A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Müller-Esterl, T. Schinke, and W. Jahnen-Dechent. The serum protein α_2 -Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3):357–66, Aug 2003.
- [218] Thorsten Schinke, Christiane Amendt, Andreas Trindl, Oliver Pöschke, Werner Müller-Esterl, and Willi Jahnen-Dechent. The serum protein α_2 -HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 271(34):20789–20796, Issue of August 23 1996.
- [219] K. Schwarz and M. Epple. Biomimetic crystallization of apatite in a porous polymer matrix. *Chemistry - A European Journal*, 4(10):1898–1903, 1998.
- [220] C. F. Schwenk, H. H. Löffler, and B. M. Rode. Molecular dynamics simulations of Ca^{2+} in water: Comparison of a classical simulation including three-body corrections and bornoppenheimer *ab initio* and density functional theory quantum mechanical molecular mechanics simulations. *Journal of Chemical Physics*, 115:10808–10814, 2001.
- [221] W. J. Shaw, A. A. Campbell, M. L. Paine, and M. L. Snead. The COOH terminus of the amelogenin, LRAP, is oriented next to the hydroxyapatite surface. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39):40263–40266, Sep 2004.
- [222] L. Sidney. Mineralization of type I collagen. *Biophysical Journal*, 85:204–207, 2003.
- [223] K. Skartsila and N. Spanos. Surface characterization of hydroxyapatite: potentiometric titrations coupled with solubility measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308(2):405–412, Apr 2007.
- [224] D. Skrtic and E. D. Eanes. Membrane-mediated precipitation of calcium phosphate in model liposomes with matrix vesicle-like lipid composition. *Bone and Mineral*, 16(2):109–119, Feb 1992.
- [225] C.I. Smith, O.E. Craig, R.V. Prigodich, C.M. Nielsen-Marsh, M.M.E. Jans, C. Vermeer, and M.J. Collins. Diagenesis and survival of osteocalcin in archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 32(1):105–113, January 2005.
- [226] Georges Socrates. *Infrared Characteristics Group Frequencies Tables and Charts*. Wiley, 2. edition, 1980.
- [227] J. S. Sørensen and H. E. L. Madsen. The influence of magnetism on precipitation of calcium phosphate. *Journal of Crystal Growth*, 216(1-4):399–406, 2000.
- [228] N. Spanos, P. G. Klepetsanis, and P. G. Koutsoukos. Model studies on the interaction of amino acids with biominerals: The effect of l-serine at the hydroxyapatitewater interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 236:260–265, 2001.

- [229] M. Sprik, J. Hutter, and M. Parrinello. *Ab Initio* molecular dynamics simulation of liquid water: Comparison of three gradient-corrected density function. *Journal of Chemical Physics*, 105(3):1142–1152, 1996.
- [230] A. R. Spurr. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1-2):31–43, 1969.
- [231] J. J. P. Stewart. Optimization of parameters for semiempirical methods i. method. *Journal of Computational Chemistry*, 10:209–220, 1989.
- [232] J. J. P. Stewart. Optimization of parameters for semiempirical methods ii. applications. *Journal of Computational Chemistry*, 10:221–264, 1989.
- [233] U. Stratmann, K. Schaarschmidt, H. P. Wiesmann, U. Plate, and H. J. Höhling. Mineralization during matrix-vesicle-mediated mantle dentine formation in molars of albino rats: a microanalytical and ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*, 284(2):223–30, May 1996.
- [234] L. F. Sukhodub, C. Moseke, L. B. Sukhodub, B. Sulkio-Cleff, V. Ya. Maleev, M. A. Semenov, E. G. Berezhnyak, and T. V. Bolbukh. Collagen - hydroxyapatite - water interactions investigated by XRD, piezogravimetry, infrared and raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 704:53–58, 2004.
- [235] Y.-L. Sun, Z.-P. Luo, A. Fertala, and K.-N. An. Direct quantification of the flexibility of type I collagen monomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(2):382–386, Jul 2002.
- [236] S.-W. Suna, Y.-C. Lina, Y.-M. Wenga, and M.-J. Chen. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3):112–117, March-May 2006.
- [237] M. Sundaralingam and F. F. Putkey. Molecular structures of amino acids and peptides. ii. a redetermination of the crystal structure of l-o-serine phosphate. a very short phosphate-carboxyl hydrogen bond. *Acta Crystallographica*, B26:790–800, 1970.
- [238] M. L. Sushko and A. L. Shluger. DLVO theory for like-charged polyelectrolyte and surface interactions. *Materials, Science and Engineering C*, 27:1090–1095, 2006.
- [239] J. R. Sutter, Hershel McDowell, and Walter E. Brown. Solubility study of calcium hydrogen phosphate ion-pair formation. *Inorganic Chemistry*, 10(8):1638–1643, 1971.
- [240] M. Szweras, D. Liu, E. A. Partridge, J. Pawling, V. Sukhu, C. Clokie, W. Jahnen-Dechent, H. C. Tenenbaum, C. J. Swallow, M. D. Grynpas, and J. W. Denni. α_2 -HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor- β /bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22):19991–19997, May 31 2002.

-
- [241] D. Tadic, F. Peters, and M. Epple. Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials*, 23:2553–2339, 2002.
- [242] H. Tanaka, K. Miyajima, M. Nakagaki, and S. Shimabayashi. Incongruent dissolution of hydroxyapatite in the presence of phosphoserine. *Colloid and Polymer Science*, 269(2):161–165, 1991.
- [243] M. G. Taylor, K. Simkiss, J. Simmons, L. N. Wu, and R. E. Wuthier. Structural studies of a phosphatidyl serine-amorphous calcium phosphate complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(2):196–202, Feb 1998.
- [244] K. S. TenHuisen and P. W. Brown. Variations in the solution chemistry during calcium-deficient and stoichiometric hydroxyapatite formation from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36:233–241, 1997.
- [245] O. B. Terkelsen, W. Jahnen-Dechent, H. Nielsen, T. Moos, E. Fink, P. Nawratil, W. Müller-Esterl, and K. Møllgård. Rat fetuin: distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. *Anatomy and Embryology*, 197(2):125–33, Feb 1998.
- [246] J. D. Termine and E. D. Eanes. Calcium phosphate deposition from balanced salt solutions. *Calcified Tissue Research*, 15(1):81–84, Jun 1974.
- [247] J. D. Termine, R. A. Peckauskas, and A. S. Posner. Calcium phosphate formation in vitro. ii. effects of environment on amorphous-crystalline transformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 140(2):318–325, 1970.
- [248] J. D. Termine and A. S. Posner. Calcium phosphate formation in vitro. i. factors affecting initial phase separation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 140(2):307–317, 1970.
- [249] Sidney Gilchrist Thomas. Manufacture of alkaline phosphates. *US Patent Nr. 301406*, Int. Class: C01B 25/00:1–2, 1884.
- [250] W. Tong, M. J. Glimcher, J. L. Katz, L. Kuhn, and S. J. Eppell. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. *Calcified Tissue International*, 72(5):592–598, May 2003.
- [251] G. Treboux, P. Layroll, N. Kanzaki, K. Onuma, and A. Ito. Existence of posners cluster in vacuum. *Journal of Physical Chemistry A*, 104:5111–5114, 2000.
- [252] G. Treboux, P. Layrolle, N. Kanzaki, K. Onuma, and A. Ito. Symmetry of posners cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 122:8323–8324, 2000.
- [253] M. J. J. M. van Kemenade and P.L. de Bruyn. A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 118(2):564–585, 1987.
- [254] Donald Voet and Judith G. Voet. *Biochemie*. Wiley-VCH Publishers, 1992.
-

- [255] W. Wagermaier, H. S. Gupta, A. Gourrier, M. Burghammer, P. Roschger, and P. Fratzl. Spiral twisting of fiber orientation inside bone lamellae. *Biointerphases*, 1(1):1–5, March 2006.
- [256] A. Y.-M. Wang, J. Woo, C. W.-K. Lam Lam, M. Wang, I. H.-S. Chan, P. Gao, S.-F. Lui, P. K.-T. Li, and J. E. Sanderson. Associations of Serum Fetuin-A with Malnutrition, Inflammation, Atherosclerosis and Valvular Calcification Syndrome and Outcome in Peritoneal Dialysis Patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 20(8):1676–1685, 2005.
- [257] H. Wang, M. Zhang, M. Bianchi, B. Sherry, A. Sama, and K. J. Tracey. Fetuin (α_2 -HS-glycoprotein) Opsonizes Cationic Macrophage-deactivating Molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24):14429–14434, November 24 1998.
- [258] L. Wang, P. S. Bose, and F. J. Sigworth. Using cryo-EM to Measure the Dipole Potential of a Lipid Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49):18528–18533, Dec 2006.
- [259] X. Wang, K. Sada, S. Yanagi, C. Yang, K. Rezaul, and H. Yamamura. Intracellular Calcium Dependent Activation of p72syk in Platelets. *Journal of Biochemistry*, 116:858–861, 1994.
- [260] J. Weidlein, U. Müller, and K. Dehnicke. *Schwingungsspektroskopie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1988.
- [261] T. J. Wess, A. P. Hammersley, L. Wess, and A. Miller. A Consensus Model for Molecular Packing of Type I Collagen. *Journal of Structural Biology*, 122:92–100, 1998.
- [262] M. S. Wilm and M. Mann. Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole’s beam of Macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136(2-3):167 – 180, 1994.
- [263] Jan Wilschut, Nejat Diizgiine, Robert Fraley, and Demetrios Papahadjopoulos. Studies on the Mechanism of Membrane Fusion: Kinetics of Calcium Ion Induced Fusion of Phosphatidylserine Vesicles Followed by a new Assay for mixing of Aqueous Vesicle Contentst. *Biochemistry*, 19:6011–6021, 1980.
- [264] E. R. Wise, S. Maltsev, M. E. Davies, M. J. Duer, C. Jäger, N. Loveridge, R. C. Murray, and D. G. Reid. The Organic-Mineral Interface in Bone is Predominantly Polysaccharide. *Chemistry of Materials*, 19(21):5055–5057, 2007.
- [265] L. N. Wu, B. R. Genge, D. G. Dunkelberger, R. Z. LeGeros, B. Concannon, and R. E. Wuthier. Physicochemical Characterization of the Nucleational Core of Matrix Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7):4404–4411, Feb 1997.

- [266] Licia N. Y. Wu, Brian R. Genge, and Roy E. Wuthier. Analysis and Molecular Modeling of the Formation, Structure, and Activity of the Phosphatidylserine-Calcium-Phosphate Complex Associated with Biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7):3827–3838, 2008.
- [267] S. Xu and J. Yu. Beneath the Minerals, A Layer of Round Lipid Particles Was Identified To Mediate Collagen Calcification in Compact Bone Formation. *Biophysical Journal*, 91(11):4221–4229, Sep 2006.
- [268] Y. Yang and Q. Cui. Interactions between Phosphate and Water in Solution: A Natural Bond Orbital Based Analysis in a QM/MM Framework. *Journal of Physical Chemistry B*, 111:3999–4002, 2007.
- [269] J. P. Yesinowski and J. J. Benedict. ^{31}P NMR as a Spectroscopic Monitor of the Spontaneous Precipitation of Calcium Phosphates. *Calcified Tissue International*, 35(3):284–286, May 1983.
- [270] S.-H. Yu, H. Cölfen, and M. Antonietti. Polymer-Controlled Morphosynthesis and Mineralization of Metal Carbonate Superstructures. *Journal of Physical Chemistry B*, 107:7396–7405, 2003.
- [271] D. Zahn. Mechanisms of Calcium and Phosphate Ion Association in Aqueous Solution. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 10:1507 – 1511, Aug 2004.
- [272] D. Zahn and O. Hochrein. Computational study of Interfaces between Hydroxyapatite and Water. *Journal of Physical Chemistry*, 5:4004–4007, 2003.
- [273] D. Zahn, K. F. Schmidt, S. M. Kast, and J. Brickmann. Quantum/Classical Investigation of Amide Protonation in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry A*, 106:7807–7812, 2002.
- [274] E. J. Zaluzec, D. A. Gage, and J. T. Watson. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: Applications in Peptide and Protein Characterization. *Protein Expression and Purification*, 6(2):109–123, 1995.
- [275] J. Zhang, A. Ebrahimpour, and G. H. Nancollas. Ion association in calcium phosphate solutions at 37°C. *Journal of Solution Chemistry*, 20(5):455–465, 1991.
- [276] Shuguang Zhang. Fabrication of novel Biomaterials through molecular Self-Assembly. *Nature Biotechnology*, 21(10):1171–1178, Oct 2003.
- [277] J. Zheng, G. H. Pollack, I. L. Cameron, and D. N. Wheatley. *Water and the Cell*. Springer Netherlands, 2006.
- [278] V. Ziv, H. D. Wagner, and S. Weiner. Microstructure-microhardness Relations in parallel-fibered and lamellar Bone. *Bone*, 18(5):417–28, May 1996.

Versicherung an Eides statt

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt entnommenen Gedanken sind als Solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Prof Sukhodub (ESI-MS), Dr. Frank Malz, Dr. Thoralf Krähl (NMR). Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden. Die Promotionsordnung der Fakultät Maschinenwesen wird anerkannt.

Ralf-René Rühl

Danke

Alle wissenschaftlichen Kollegen an der TU-Dresden und außerhalb waren freundlich, aufgeschlossen und unterstützend. Insbesondere möchte ich „meiner“ (hier subjektiv erweiterten) Arbeitsgruppe, für die vielen Diskussionen und die schöne Zeit die ich in Dresden hatte danken (Florian Despang, Anja Walther, Marleen Eckard, Frau Zieschang, Herrn Bäcker, Armin Springer, Ricarda Heß, René Beutner, Lotta Römhildt, Anja Lode, Anne Bernhardt, Jirut Meesane, Marita Keil).

- Vielen Dank an Kathrina Henninger für die Geduld und das Korrekturlesen
- Herr Prof. L. Sukhodub, für die Zusammenarbeit beiden Osteocalcin ESI-MS Messungen
- Herrn Dr. I. Bauer vom Institut für organische Chemie der TU-Dresden für ESI-MS Messungen und den Datenexport der Serin und Phosphoserin Proben
- Herrn PD Dr. D. Kuckling vom Institut für Makromolekulare Chemie der TU-Dresden, für die MALDI-MS Messungen
- Vielen Dank an Herrn Mensch und die Mitarbeiter des Berndt-Baus für die Unterstützung bei den REM-Untersuchungen
- Vielen Dank an Herrn Dr. Thoralf Krahle (BAM) für die Hilfe bei der Interpretation der NMR Spektren
- Vielen Dank an Herrn Dr. Armin Springer für die Hilfe beim Einbetten der TEM Proben und TEM Aufnahmen
- Dr. M. Mertig für den Zugang zum AFM
- Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Pompe und Herrn Dr. Gelinsky, die diese Doktorarbeit ermöglicht haben, mir diese Chance gegeben haben und für die große wissenschaftliche Freiheit, die ich genossen habe.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen publiziert:

Ralf Rühl, Katharina Lau, Michael Gelinsky, Wolfgang Pompe: *Dissolution and precipitation of calcium phosphates under control of non collagenous proteins, observed in situ with AFM*; 3rd International Workshop for Scanning Probe Microscopy in Life Science, Berlin, 2005 (Poster)

Ralf Rühl, Steffi Lenhard, Wolfgang Pompe, Michael Gelinsky: *Dissolution and precipitation of calcium phosphates under control of non collagenous proteins, observed in situ with AFM*; 2nd Max Bergmann Symposium, Dresden, 2005 (Poster)

Ralf Rühl, Steffi Lenhard, Wolfgang Pompe, Michael Gelinsky: *In Vitro Model Investigations on the Influence of Collagen, Osteocalcin and Fetuin on Calcium Phosphate Precipitation*; The 9th International Symposium on Biomineralization, Pucon, Chile, 2005 (Vortrag und Paper)

Sebastian Thieme, Ralf Rühl, Wolfgang Pompe, Angela Rösen-Wolff, Michael Gelinsky: *In vitro models of bone biomineralization*; Berichtskolloquium des SPP 1117 der DFG, Bad Honnef, 2006 (Vortrag und Poster)

Ralf Rühl, Anne Bernhardt, Anja Lode, Ulla König, Armin Springer, Eckehard Rudolph, Thomas Hanke, Michael Gelinsky: *Establishing the basis of tissue engineering: developing in vitro models for bone biomineralisation, remodeling, vascularisation and nanotoxicity*; Sächsischer Biotechnologietag, Dresden, 2007 (Poster)

Index

- 6-31G
 - Glossar, 175
 - Präparation, 22
- ACN
 - Glossar, 175
- ACP-Nanokugeln
 - Einführung, 8
 - Ergebnisse, 52
 - Präparation, 32
- AFM
 - Glossar, 175
 - Präparation, 35
 - tapping mode, Glossar, 186
- AFM-Spitzen
 - Glossar, 175
- Agarose
 - Glossar, 175
 - Präparation, 34
- APCI
 - Glossar, 176
- Basisset
 - Computermodellierung, 20
 - Glossar, 176
- Bindungsenergie
 - Computermodellierung, 20
 - Ergebnisse, 48
- Bio+/CHARMM
 - Glossar, 176
 - Präparation, 22
- Bleicitrat
 - Glossar, 176
- Brushit
 - Glossar, 176
 - im AFM, 88
 - Präparation, 24
- Calcimycin
 - Glossar, 176
 - Präparation Vesikel, 27
- Calciumphosphat
 - Präparation
 - AFM, 36
 - Brushit, 24
 - Hanteln, 33
 - REM, 32
 - Stammlösung, 24
 - Einführung, 7
 - Ergebnisse
 - Computermodellierung, 44
 - FT-IR-Spektroskopie, 72
 - REM und AFM Abbildungen, 52
 - simulierte IR-Spektren, 47
- CHARMM
 - Glossar, 176
- Computermodellierung
 - Hydrathülle von Ca^{2+} und P_i , 44
 - Methoden, 20
 - Parameter, 23
 - Vergleich mit Literaturwerten, 129
- contact mode
 - Glossar, 177
- cutoff energy
 - Glossar, 177
- DMSO
 - Glossar, 177
- DPPC
 - Glossar, 177
 - Präparation Vesikel, 27
- EDX
 - Glossar, 177
 - Vesikel, 172
- Einbetten
 - TEM-Proben, 34
- Elementaranalyse
 - Ergebnisse, 82
- Epiphyse
 - Einführung, 2
 - Glossar, 177
- Epoxidharz
 - Glossar, 177
 - Präparation, 34

- ESI-MS
 - Glossar, 178
 - Präparation, 30
- Ether
 - Glossar, 178
- Etidronate
 - Glossar, 178
- Fetuin
 - Einführung, 13
 - Ergebnisse, 88
 - Glossar, 178
 - in Tapes (REM), 169
 - mit Kollagen und Calciumphosphat (REM), 170
 - Präparation, 33
- FT-IR
 - Präparation, 28
 - Ergebnisse, 72
 - Glossar, 178
 - Terminologie, 139
 - vollständige Wertetabelle, 140
- Glimmer
 - Glossar, 179
- Glutaraldehyd
 - Glossar, 179
- Glykosaminoglykane
 - Glossar, 179
- HCCA
 - Glossar, 179
 - Präparation, 31
- Hydroxylapatit
 - Glossar, 179
- Hydrathülle, 7
 - Ca²⁺ und Pi, Computermodellierung, 44
 - Wertetabelle Bindungsenergien, 137
- Hydrindantin
 - Glossar, 180
 - Präparation, 28
- in lens
 - Glossar, 180
- in vitro
 - Glossar, 180
- in vivo
 - Glossar, 180
- Infrarotspektroskopie
 - siehe FT-IR, Ergebnisse, 72
- Ionophoren
 - Glossar, 180
 - Präparation, 27
- KBr Tabletten
 - Präparation, 28
- knockout Maus
 - Einführung, 14
 - Glossar, 180
- Kollagen
 - Einführung, 11
 - Ergebnisse, 107
 - Glossar, 180
 - Präparation
 - Nachmineralisierung im AFM, 37
 - Assemblierung, 29
 - mit Fetuin, 30
- kritische Keimgrösse, 8
 - Einführung, 7
 - Glossar, 181
- LCAO
 - Glossar, 181
- MALDI
 - Glossar, 181
 - Präparation, 31
- Massenspektroskopie
 - Präparation, 30
- Minimalenergie
 - Computermodellierung, 20
- Molekularmechanik
 - Glossar, 181
- Molekularmodellierung
 - siehe Computermodellierung, 20
- MP2
 - Glossar, 181
 - Präparation, 20
- Mulliken-Ladungen
 - Calciumphosphat, 46
 - Computermodellierung, 20
 - Glossar, 181
- Nernst'sche Diffusionsschicht
 - Ergebnisse, 98
 - Glossar, 182
- Ninhydrin
 - Glossar, 182
 - Präparation, 28

- NMR
 - Präparation, 41
 - Glossar, 182
- Nukleation
 - Einführung, 7
 - Glossar, 183
- Octacalciumphosphat
 - Glossar, 183
- Osmiumtetroxyd
 - Glossar, 183
 - Präparation, 34
- Osteocalcin
 - Aminosäuresequenz, 168
 - Einführung, 12
 - Experimente, 101
 - Glossar, 183
 - Präparation, 31
- Osteon
 - Einführung, 2
 - Glossar, 183
- Parakristallin
 - Einführung, 12
 - Glossar, 184
- Phosphat
 - in Wasser, Computermodellierung, 45
- Phospholipide
 - nicht als Vesikel, 171
 - siehe Vesikel, 34
- Phosphorpentoxyd
 - Glossar, 184
 - Präparation, 26
- Phosphoserin
 - Einführung, 10
 - Ergebnisse, 58
 - AFM und REM, 65
 - Computermodellierung, 58
 - FT-IR-Simulation, 72
 - FT-IR-Spektroskopie, 72
 - Massenspektrometer, 59
 - Massenspektrometer Wertetabellen, 161
 - NMR, 69
 - Glossar, 184
 - Präparation
 - Massenspektroskopie, 30
 - NMR, 41
 - Phosphorylierung, 26
- Proteoglycanmatrix
 - Glossar, 184
- Proteoglykane
 - Glossar, 184
- Pyrophosphat
 - Einführung, 4
 - Glossar, 184
- REM
 - Präparation, 32
 - Glossar, 184
- SAXS
 - Glossar, 184
- SBF
 - Glossar, 185
- Scaffold
 - Glossar, 185
 - Präparation, 30
- SCF
 - Glossar, 185
- schnelles einfrieren
 - Präparation, 25
- Schritt Algorithmus
 - Glossar, 185
 - Präparation, 23
- Serin
 - FT-IR, 138
 - Präparation, MS, 30
- Si-Waver
 - Glossar, 185
- simulierte IR-Spektren
 - Calciumphosphat, 47
 - Glossar, 185
 - Phosphoserin, 72
- single point calculation
 - Glossar, 186
- spin multiplicity
 - Glossar, 186
- STO
 - Glossar, 186
 - Präparation, 23
- Tapes
 - Glossar, 186
 - im REM, 96
 - Präparation, 29
 - Präparation mit Fetuin, 33

tapping mode

Glossar, 186

TEM

Ergebnisse, 114

Glossar, 187

Präparation, 34

templatin

Einführung, 4

TFA

Glossar, 187

Präparation, 31

Transfektion

Glossar, 187

TRIS

Glossar, 187

Präparation, 29

Tropokollagen

Einführung, 11

Glossar, 187

Uranylacetat

Glossar, 187

Präparation, 35

UV/vis

Ergebnisse, 94

Glossar, 188

Präparation, 28

Valinomycin

Glossar, 188

Präparation Vesikel, 27

Vesikel

Einführung, 14

Ergebnisse, 112

Präparation

Arbeitsschritte, 27

REM, 34

Versuche, 38

XRD

Präparation, 41

Ergebnisse, 82

Glossar, 188

Zeta-Potential

Glossar, 188